

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

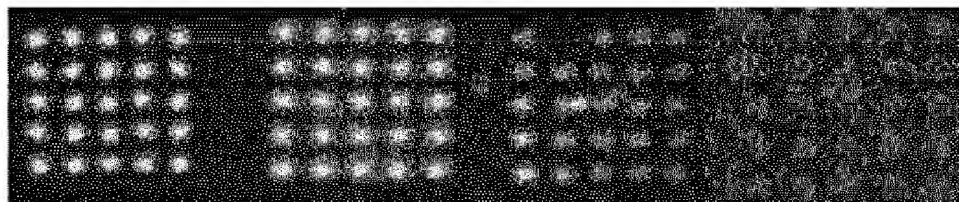
(10) 国際公開番号
WO 2005/062046 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 33/58, 37/00, 21/64, 21/66, C12Q 1/68, 1/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019215
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-427268
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 又賀 駿太郎 (MATAKA, Shuntaro) [JP/JP]; 〒8160904 福岡県大野城市大池 2 丁目 1 7 番 5 号 Fukuoka (JP). 竹中 繁織 (TAKENAKA, Shigeori) [JP/JP]; 〒8113114 福岡県古賀市舞の里 4-2 3-2 1 Fukuoka (JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 磯部 信一郎 (ISOBE, Shinichiro) [JP/JP]; 〒8111351 福岡県福岡市南区屋形原 1 丁目 1 9-2 8-1 2 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BIOMOLECULE, LABELING DYE USED THEREFOR, AND LABELING KIT

(54) 発明の名称: 生体分子の検出方法及びそれに用いる標識色素並びに標識キット



(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting a biomolecule wherein a biomacromolecule sample and an organic EL dye are reacted with each other and the fluorescence of the biomacromolecule sample labeled with the organic EL dye is measured. By using an organic EL dye as a labeling dye, a biomacromolecule can be detected more sensitively at lower cost.

(57) 要約:

生体高分子試料と有機EL色素とを反応させ、有機EL色素で標識された該生体高分子試料の蛍光を測定する。標識色素に有機EL色素を用いることにより、より低コスト、かつ高感度に生体高分子を検出することができる。

WO 2005/062046 A1



SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

生体分子の検出方法及びそれに用いる標識色素並びに標識キット 技術分野

[0001] 本発明は、蛍光色素を用いる、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類等の生体分子の検出方法及びその検出方法に用いる標識色素並びに標識キットに関する。

背景技術

[0002] 現在、世界的に特定遺伝子解析技術、遺伝子治療、テーラーメイド医療を目的としたポストゲノム研究が盛んに行われている。遺伝子解析技術としては、例えば、DNAマイクロアレイを用いたDNAの検出方法が用いられている。この検出方法によれば、多種類の遺伝子発現、機能性、変異等の同時解析を簡便かつ迅速に行うことができる。

[0003] DNAマイクロアレイを用いた検出方法は、多数のDNA又はオリゴヌクレオチドの配列(プローブ核酸)を、ガラス又はシリコン等の基板上にスポット固定したDNAチップを用いる。基板上に固定したプローブ核酸と、標識した試料RNA(標的核酸)とのハイブリダイゼーションによりプローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。そしてマイクロアレイを乾燥後、標識された標的核酸の蛍光強度を測定する。

[0004] 標識には、蛍光色素が広く使用されており、高い蛍光強度を有すること、乾燥状態(固体状態)でも発光すること、そして水溶性を有することなどが要求されている。蛍光色素としては、例えば、Cy3やCy5が使用されている(例えば、非特許文献1を参照されたい)。

非特許文献1: Science 283,1, January, 1999, 83-87

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、Cy3やCy5は、高い蛍光強度を有し、固体状態でも発光する利点を有するが、非常に高価であるため、検出方法が高コストにならざるを得ない。また、試

料RNA中への取り込み率が低く、試料RNAに対して十分な標識ができないため検出感度が十分でないという問題もある。これに対し、Cy3やCy5に代わる蛍光色素が見出されていないのが現状である。

[0006] そこで、本発明は、上記課題を解決し、より低コストで高感度の生体分子の検出方法を提供することを目的とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、Cy3やCy5に代わる蛍光色素を探索する過程において、有機EL素子に使用されている有機EL色素が、生体分子の標識として用いた場合、高い蛍光強度を有することを見出して本発明を完成させたものである。

[0008] すなわち、本発明の生体分子の検出方法は、生体分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体分子試料の蛍光を測定することを特徴とする。ここで、本発明において生体分子とは、生体中に存在する分子種を意味し、生体の構造を構築するためのもの、エネルギーの生産・変換に関与するもの、そして生体情報をつかさどるものが含まれる。具体的には、核酸、タンパク質、糖類、脂質、ペプチド類、ヌクレオチド、代謝中間体や代謝酵素系、ホルモン、そして神経伝達物質等が含まれる。

[0009] また、有機EL色素と生体分子との間に、アミド結合、イミド結合、ウレタン結合、エステル結合又はグアニジン結合を形成させることができる。また、生体分子と反応させるに先立って、上記有機EL色素に、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の反応性基を導入することができる。また、生体分子試料に、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。

[0010] また、本発明の生体分子の検出方法は、共役系を有し、1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む5員環化合物、を含む標識色素を用いて生体分子試料を標識し、その標識された生体分子試料の蛍光を測定することを特徴とする。

[0011] また、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾ

ール誘導体を用いることができる。また、上記生体分子と反応させるに先立って、有機EL色素に、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を導入することができる。

[0012] また、本発明の標識色素は、蛍光測定による生体分子の検出に用いる標識色素であって、生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成ることを特徴とする。その反応性基としては、カルボン酸基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を用いることができる。また、有機EL色素には、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む化合物を用いることができる。さらに、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体を用いることができる。

[0013] また、本発明の生体分子用標識キットは、生体分子を標識する有機EL色素を含むことを特徴とする。生体分子には、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いることができる。その反応性基としては、カルボン酸基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の官能基を用いることができる。また、有機EL色素には、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む化合物を用いることができる。さらに、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を用いることもできる。さらに、その5員環化合物には、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体を用いることができる。

[0014] また、本発明の別の生体分子の検出方法は、生体分子試料と、有機EL色素で標識されたプローブとを反応させ、該生体分子試料の蛍光を測定することを特徴とする。ここで、上記生体分子試料が核酸であり、上記プローブには該核酸の塩基配列に

相補的なオリゴヌクレオチド又はPNAを用いることができる。また、上記オリゴヌクレオチドがプライマー又はターミネータである場合、上記核酸を増幅させて蛍光を測定することができる。また、上記核酸の増幅に先立ってプライマーを有機EL色素で標識することもできる。さらに、上記オリゴヌクレオチド又はPNAをモレキュラービーコンで構成することもできる。

[0015] また、本発明の別の生体分子の検出方法は、生体分子試料を電気泳動によりサイズ分離する工程を含み、電気泳動に先立ってあるいは電気泳動後に生体分子試料を有機EL色素で標識することを特徴とする。ここで、上記生体分子試料が核酸であり、標識された核酸の電気泳動画像に基づいて該核酸の塩基配列を決定することができる。また、上記生体分子試料がタンパク質であり、標識されたタンパク質の電気泳動画像に基づいて取り出したタンパク質を質量分析することもできる。

[0016] 本発明の標識キットを例えばDNAマイクロアレイのキットとして用いる場合、生体分子試料に核酸を用い、プローブ核酸をマイクロアレイに固定する一方、試料である標的核酸を有機EL色素と反応させて標識し、その標識された標的核酸をマイクロアレイにスポットしてハイブリダイゼーションを行うこともできる。また、アビジン(ストレプトアビジン)-ビオチン間の結合を応用し、この色素で修飾したアビジンを用いてELISA(酵素免疫測定法)やウェスタン・ブロットなどの生物学的アッセイキットとして用いることもできる。また、タンパクアレイのキットとして用いることもできる。

[0017] また、本発明の染色方法は、組織又は細胞試料中の生体分子を有機EL色素で標識することを特徴とする。ここで、上記生体分子には、核酸又はタンパク質を用いることができる。

[0018] また、本発明の染色色素は、組織又は細胞試料の染色に用いる染色色素であって、組織又は細胞中の生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成ることを特徴とする。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、生体分子の標識色素として有機EL色素を用いることにより、以下のような効果が得られる。

すなわち、有機EL色素は固体状態(固体及び半固体を含む)で高い量子収率を有

しており高い蛍光強度を有している。さらに、有機EL色素はCy3やCy5に比べ安価であるので、より低コストで生体分子の検出を行うことができる。また、有機EL色素は生体分子とほぼ定量的に反応し、高い取り込み率を有しているので、高い検出感度を得ることができる。また、蛍光波長の選択の自由度が増加し、オレンジ、イエロー、グリーン、ブルーなど多くの蛍光波長を用いることができる。これにより、ストークスシフトの大きい(励起波長と蛍光波長の差が大きい)2種以上の蛍光色素を用いることが可能となるので、一つの試料中に含まれる複数の標的核酸を同時に検出することも可能となる。また、Cy3やCy5は冷凍保存する必要があるのに対し、有機EL色素は化学的に安定であり、常温での長期保存に耐えることができるので、取り扱いが容易である。

図面の簡単な説明

- [0020] [図1A]本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルの一例である。
- [図1B]本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドの目的物のUVスペクトルの一例である。
- [図2]本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドのTOF MSスペクトルの一例である。
- [図3]本発明の実施例1における、標識されたオリゴヌクレオチドの発光パターンの一例であり、(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。
- [図4A]本発明の実施例2における、標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルの一例である。
- [図4B]本発明の実施例2における、標識されたオリゴヌクレオチドの目的物のUVスペクトルの一例である。
- [図5]本発明の実施例2における、標識されたオリゴヌクレオチドの発光パターンの一例であり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ500fmol、250fmol、100fmol、50fmol、10fmolの結果を示す。
- [図6A]本発明の実施例3における、標識されたペプチドの精製前のHPLCスペクトル

の一例である。

[図6B]本発明の実施例3における、標識されたペプチドの精製後のHPLCスペクトルの一例である。

[図7]本発明の実施例3における、標識されたペプチドのTOF MSスペクトルの一例である。

[図8]本発明の実施例3における、標識されたペプチドの発光パターンの一例であり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。

[図9A]本発明の実施例4における、標識されたタンパク質の標識前のTOF MSスペクトルの一例である。

[図9B]本発明の実施例4における、標識されたタンパク質の標識後のTOF MSスペクトルの一例である。

[図10]本発明の実施例4における、標識されたタンパク質の発光パターンの一例である。

[図11]本発明の検出方法において、プローブにモレキュラービーコンを用いた場合の発光機構を示す模式図である。

[図12]本発明の検出方法において、IgG抗体のFab'フラグメントの調製方法の一例を示す模式図である。

[図13]本発明の検出方法において、IgG抗体のFab'フラグメントへの有機EL色素の導入方法の一例を示す模式図である。

符号の説明

- [0021]
- 1 基板
 - 2 電極
 - 3 電極
 - 4 プローブ核酸
 - 4a 有機EL色素
 - 5 標的核酸

発明を実施するための最良の形態

[0022] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明に用いる有機EL色素は、一对の陽極と陰極との間に固体状態で挟持され、陽極から注入された正孔と陰極から注入された電子とが再結合する際のエネルギーにより発光可能な色素であれば特に限定されない。例えば、テトラフェニルブタジエンやペリレン等の多環芳香族化合物、シクロペンタジエン誘導体、ジスチリルピラジン誘導体、アクリドン誘導体、キナクドリン誘導体、スチルベン誘導体、フェノチアジン誘導体、ピラジノピリジン誘導体、アゾール誘導体、イミダゾール誘導体、カルバゾール誘導体そしてテトラフェニルチオフェン誘導体等を用いることができる。さらに、分子内にカルボン酸基を有し、又はカルボン酸基を導入可能な色素であることが好ましい。以下に述べるように、生体分子と結合するための反応性基の導入を容易に行うことができるからである。

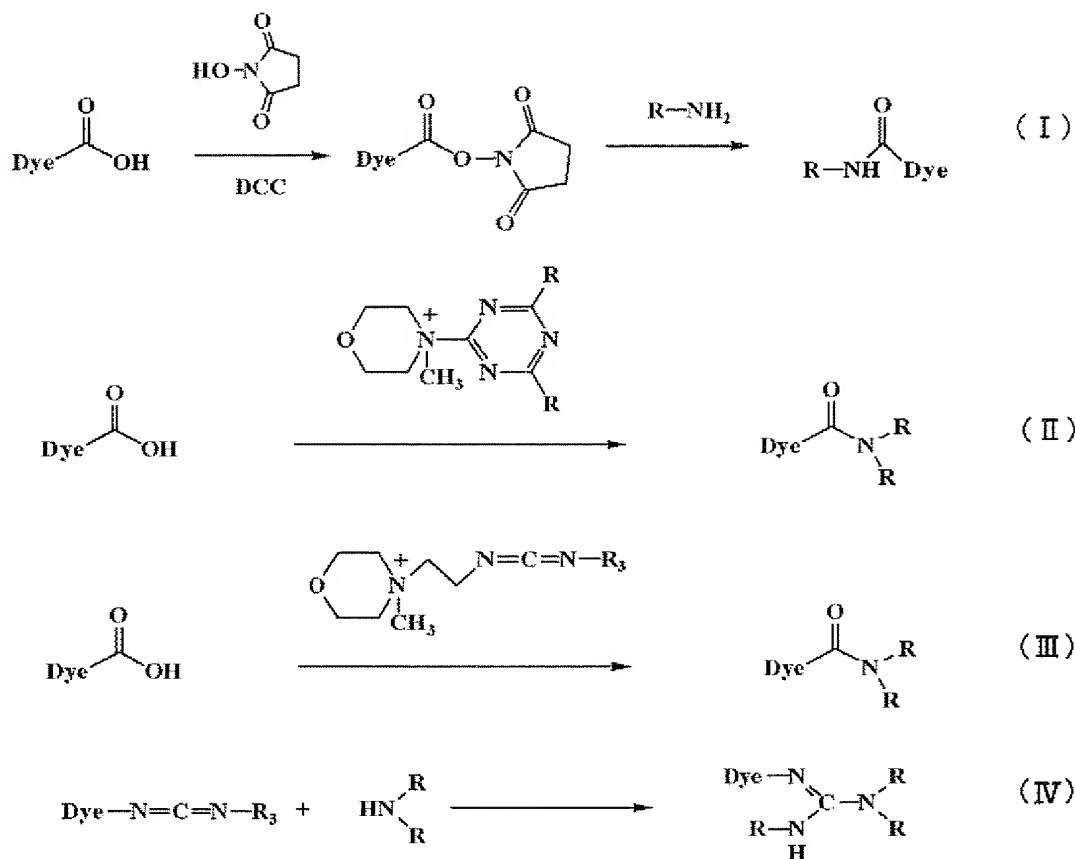
[0023] 有機EL色素は、生体分子試料(以下、標的分子という)と結合するための反応性基を有することが好ましく、その反応性基には、標的分子のアミノ基、イミノ基、チオール基又はヒドロキシル基と反応可能な官能基を有するものが好ましい。有機EL色素と生体分子との間に、アミド結合、イミド結合、ウレタン結合、エステル結合、又はグアニジン結合を形成させることが好ましい。その官能基には、例えば、イソチオシアネート基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化スルホニル基、塩化アシル基、ハロゲン化アルキル基、グリオキザル基、アルデヒド基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基等を用いることができる。好ましくは、イソチオシアネート基、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種を用いることが好ましい。より好ましくは、イソシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種を用いることが好ましい。標的分子のアミノ基とアミド結合を形成することができ、また生体分子内のイミノ基に直接結合する事ができるからである。さらに好ましくはトリアジン基、カルボジイミド基又は活性エステル化したカルボニル基である。また、これらの有機EL色素がカルボン酸基を有する場合、カルボジイミド誘導体、トリアジン誘導体の存在下で、生体分子中に存在するアミノ基およびイミノ基

を直接修飾する事も可能である。さらに、置換基を有しても良いトリアジン基、置換基を有しても良いカルボジイミド基を有する有機EL色素は、DNA塩基中のグアニン、チミンのイミノ基と直接反応するため、PCR法による色素の導入を行う必要が無く、ミスマッチ検出(二本鎖を形成していない塩基の検出)が可能であり、SNP(1塩基多型)解析の試薬として用いることが可能である。

[0024] 例えば、活性エステル化したカルボニル基には、N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルやマレイイミドエステルを用いることができる。N-ヒドロキシ-スクシンイミドを用いることにより、以下のスキーム1の式Iに示すように、縮合剤としてDCCを用いることによりN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル体を経由してアミド結合によりEL色素と標的分子が結合する。また、スキーム1の式IIに示すように、活性エステル化したカルボニル基には、トリアジン誘導体を用いることもできる。また、カルボジイミド基には、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)や1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド等のカルボジイミド試薬を用いることができる。カルボジイミド体を経由してアミド結合によりEL色素と標的分子を結合させることができる(式III)。また、分子内に予めカルボジイミド基、トリアジン基を導入したEL色素を、生体分子内のアミノ基、イミノ基に対して直接結合させる事もできる(式IV)。

[0025] さらに、有機EL色素の置換基を変えることにより、励起波長及び発光波長を変化させることができるので、多色化によりあらゆる基板上で多種類の試料の同時検出を行うこともできる。

[0026] [化1]



スキーム1.

[0027] なお、標的分子がDNAの場合にはオリゴDNA末端に修飾されたアミノ残基と、タンパク質の場合にはアミノ残基と、ペプチド類の場合にはポリペプチドのアミノ基と、例えばポリリシン誘導体のアミノ残基と、そして糖類の場合には多糖類誘導体骨格内のアミノ基と反応性基を結合させることができる。

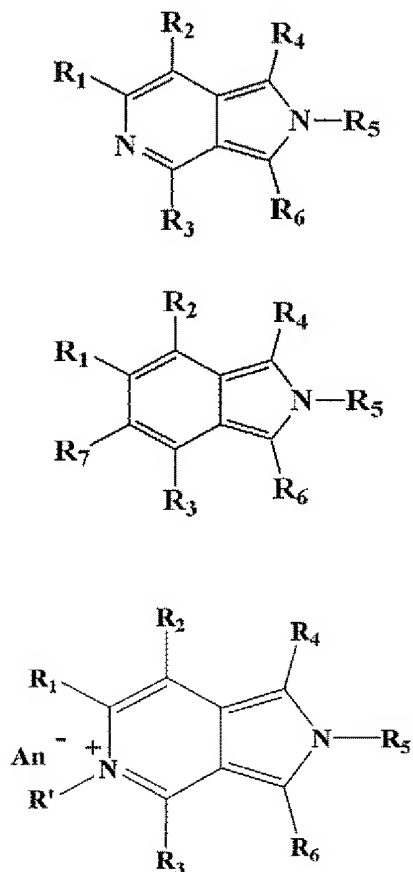
[0028] 本発明の検出方法に用いる好ましい有機EL色素は、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、その5員環化合物が1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含むものを挙げることができる。さらに、詳しくは共役系を有する5員環化合物から成る単環化合物と、その5員環化合物と共役系を有する6員環化合物から成る縮合多環化合物を挙げることができる。固体状態であっても、量子収率が大きく、強い蛍光を示すからである。5員環化合物には、アゾール誘導体あるいはイミダゾール誘導体が好ましい。さらに、アゾール誘導体あるいはイミダゾール誘導体は1

以上の4級アンモニウム基を有することが好ましい。水溶性を向上させることができるからである。

以下に、縮合多環化合物の具体例について説明する。

[0029] (モノアゾール誘導体1)

[化2]

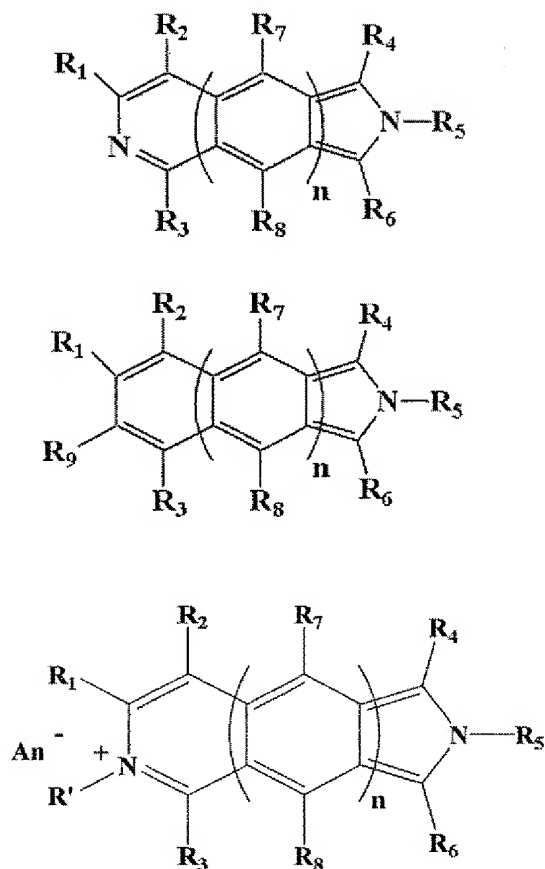


[0030] ここで、式中、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇は同じでも異なってもよい。

R'は芳香環を含んでも良いアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基、An⁻は、Cl⁻、Br⁻、I⁻等のハロゲン化物イオン、CF₃SO₃⁻、BF₄⁻、PF₆⁻を示す。なお、以下の一般式においても、特に断らない限り同様である。

[0031] (モノアゾール誘導体2)

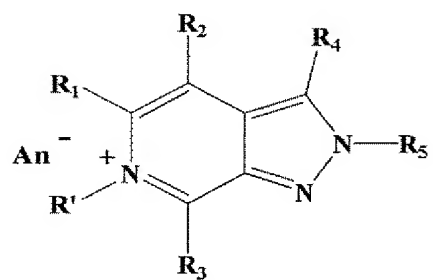
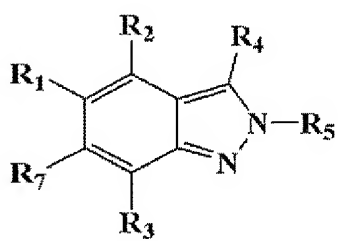
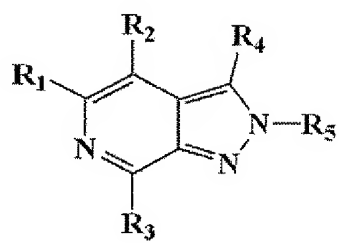
[化3]



[0032] ここで、式中、 R_8 、 R_9 は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、スルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_8 、 R_9 は同じでも異なってもよい。なお、以下の一般式においても、特に断らない限り同様である。また、 n は1以上の整数、好ましくは1〜5であり、以下の一般式中でも同様である。

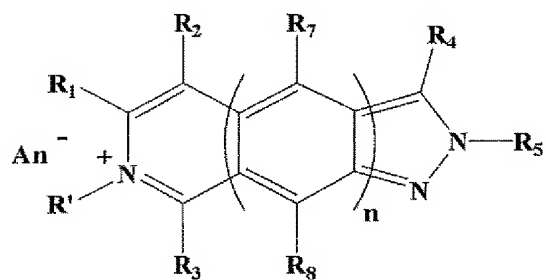
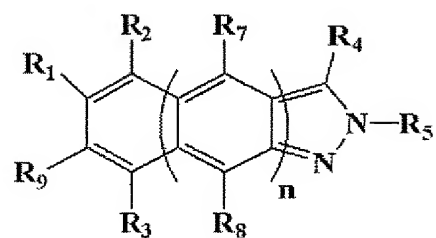
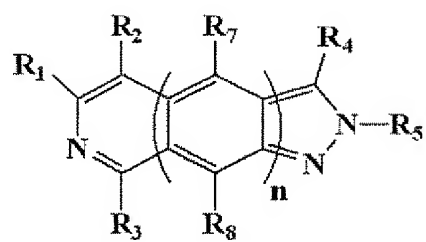
[0033] (ジアゾール誘導体1)

[化4]



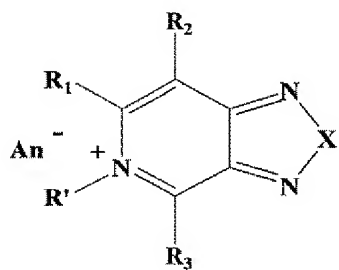
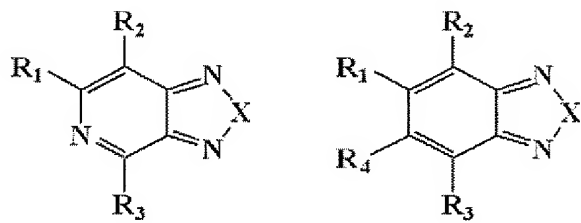
[0034] (ジアゾール誘導体2)

[化5]



[0035] (ジアゾール誘導体3)

[化6]

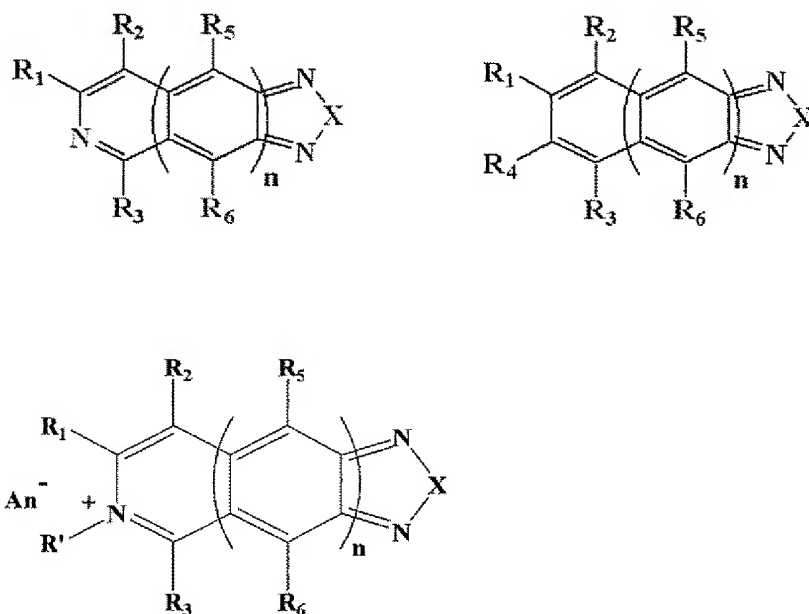


[0036] ここで、式中、R₁、R₂、R₃、R₄は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒド

ロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 は同じでも異なってもよい。 R_2 、 R_3 は、置換基を有しても良い芳香族炭化水素基を用いることが好ましく、その置換基には炭素数1から4のアルキル基やアルコキシ基、又は臭素原子を用いることが好ましい。さらに、アルキル基にはメチル基、アルコキシ基にはメキシ基を用いることが好ましい。また、Xは、置換基を有しても良い窒素原子、硫黄原子、酸素原子、セレン原子又はボロン原子であり、特に断らない限り以下の一般式中でも同様である。

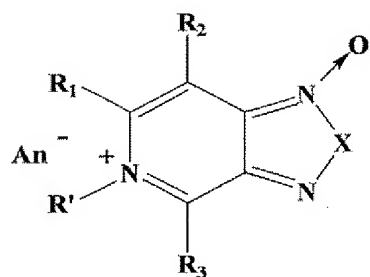
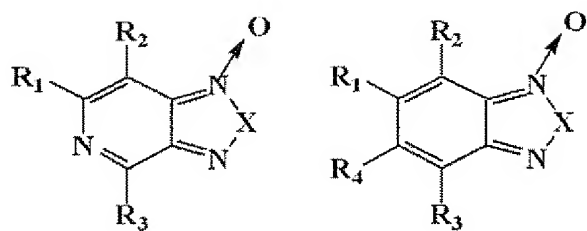
[0037] (ジアゾール誘導体4)

[化7]



[0038] (ジアゾール誘導体5)

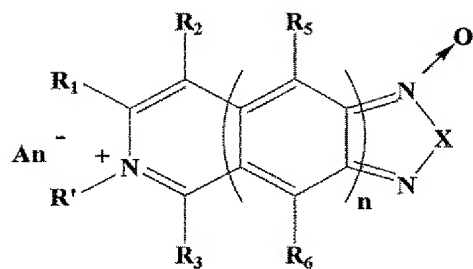
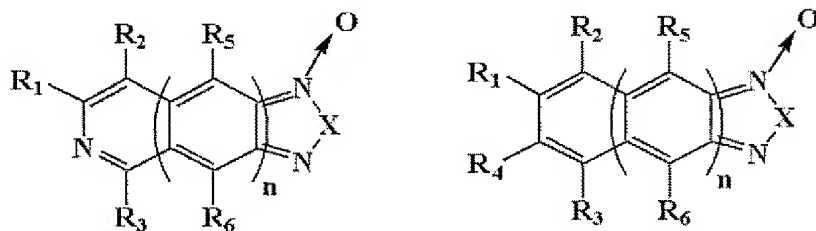
[化8]



ここで、 $N \rightarrow O$ は、窒素原子が酸素原子に配位結合している状態を示す。

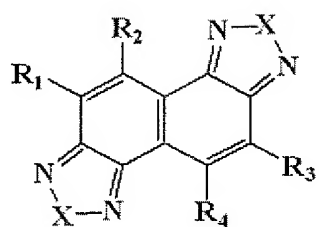
[0039] (ジアゾール誘導体6)

[化9]



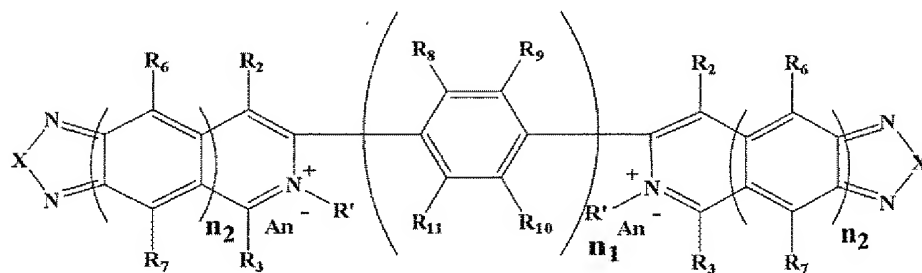
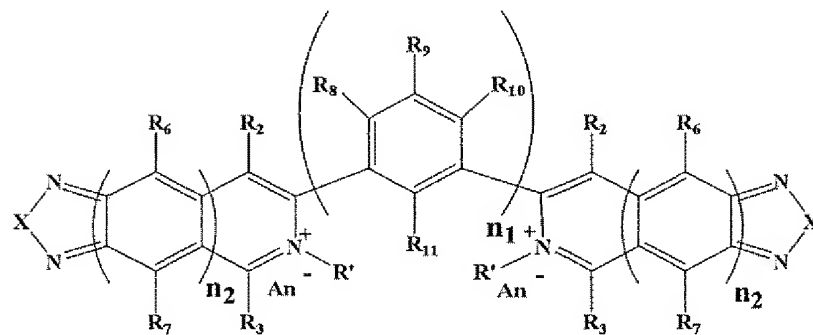
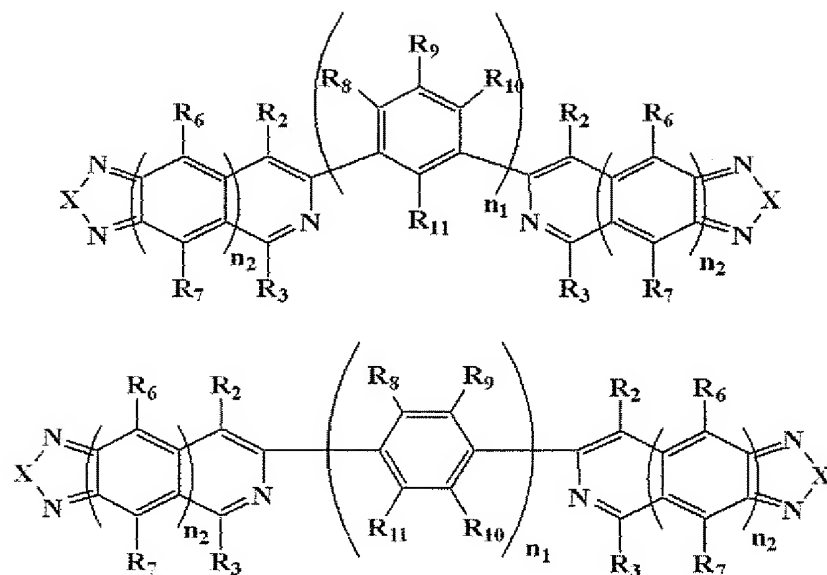
[0040] (ジアゾール誘導体7)

[化10]

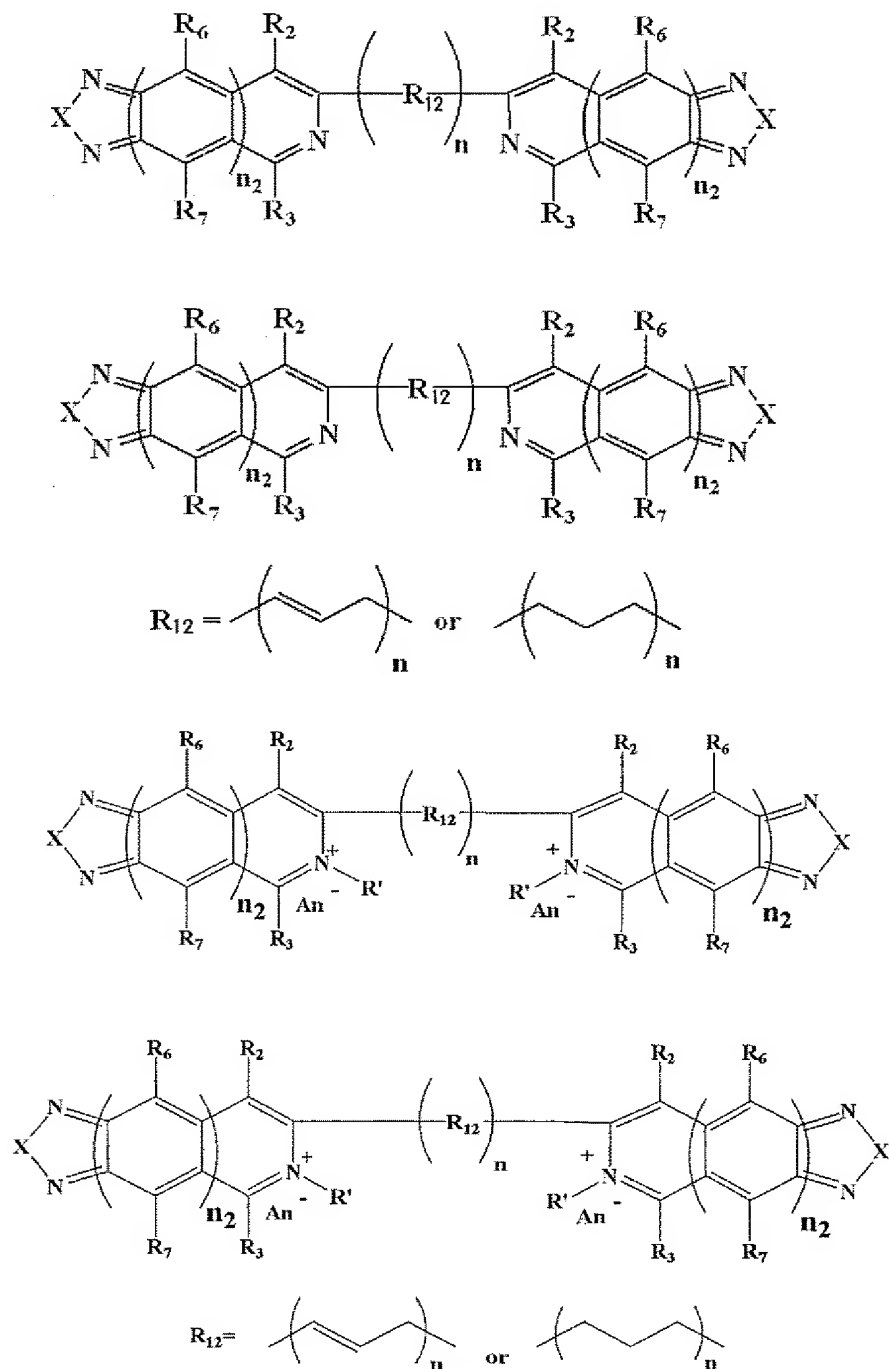


[0041] (ジアゾール誘導体8)

[化11-1]



[0042] [化11-2]

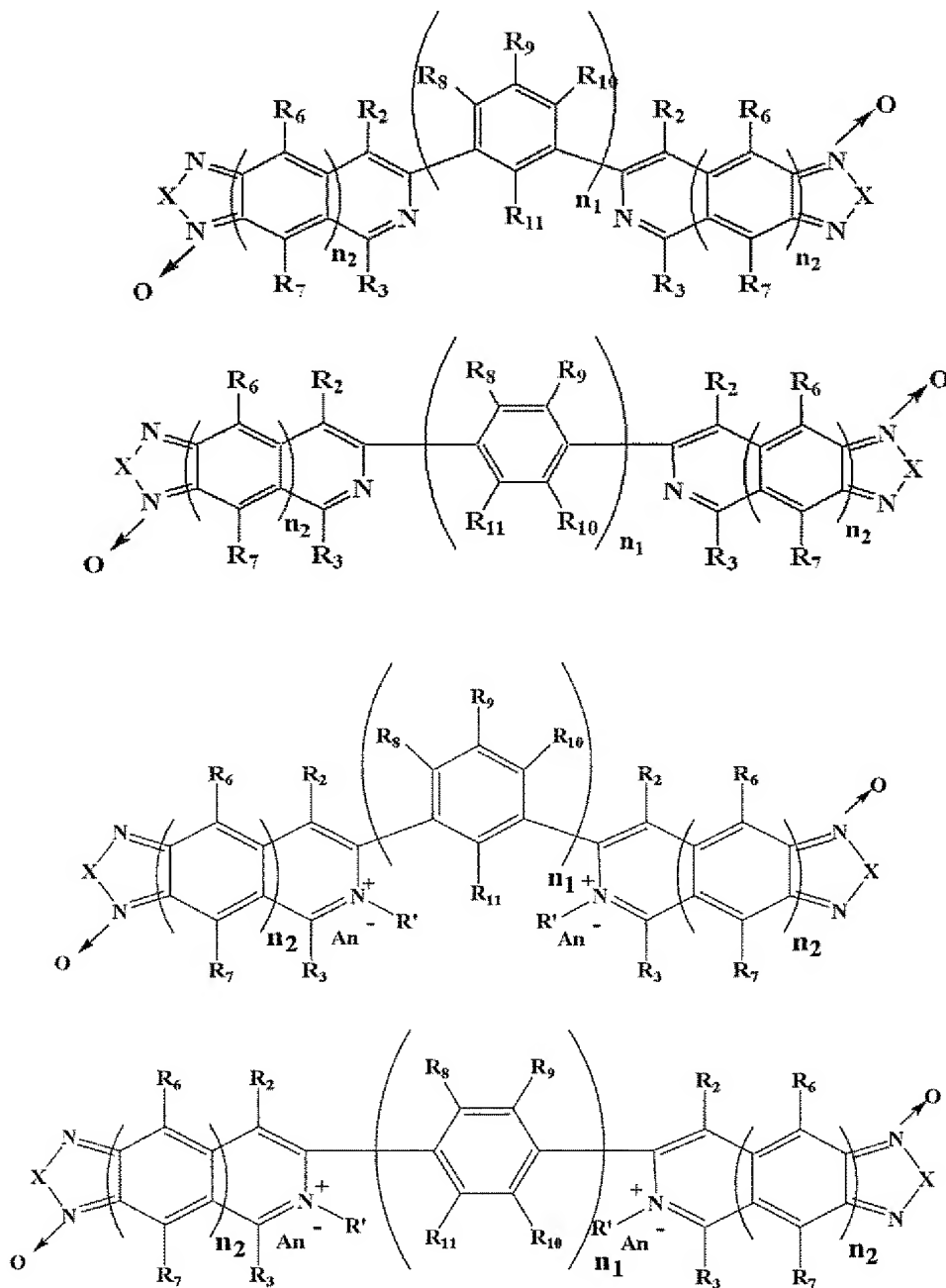


[0043] ここで、式中、 R_{10} 、 R_{11} は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_{10} 、 R_{11} は

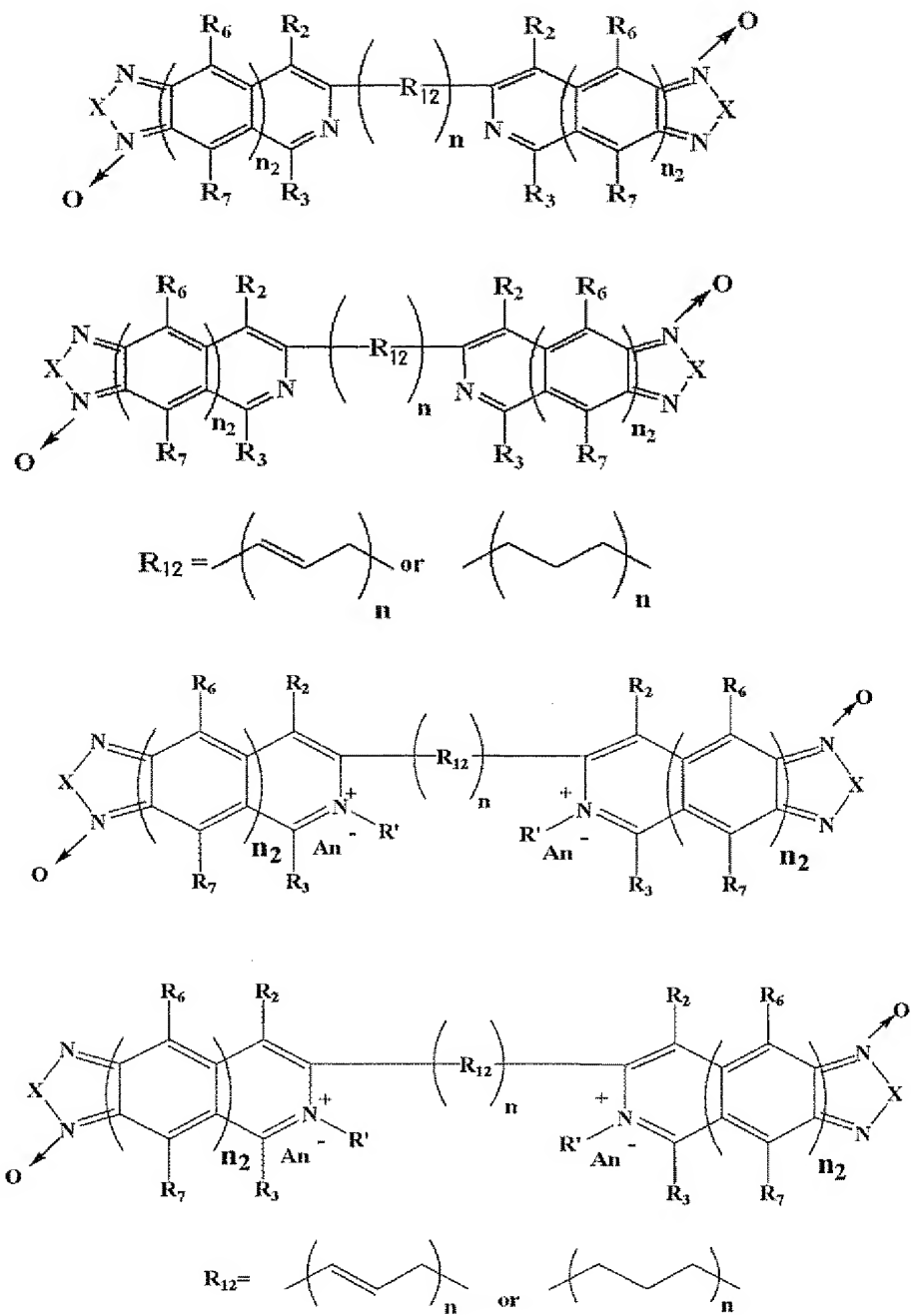
同じでも異なってもよい。また、 R_{12} は、置換基を有してもよいオレフィン基又はパラフィン基であり、 n は1から3の整数、好ましくは1である。なお、以下の一般式においても、特に断らない限り同様である。

[0044] (ジアゾール誘導体9)

[化12-1]

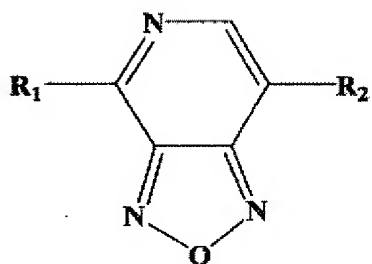


[0045] [化12-2]



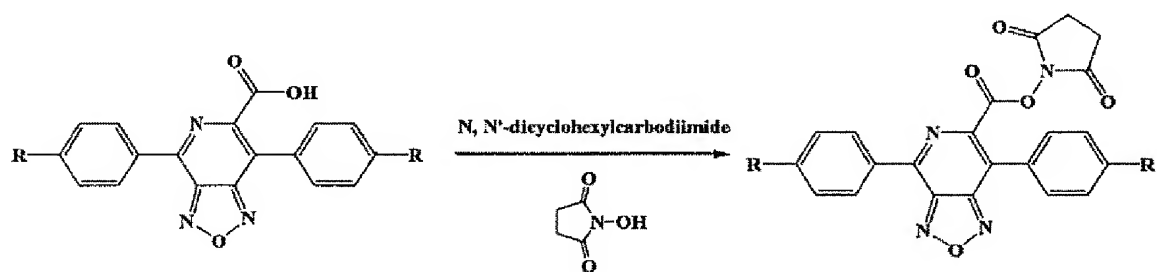
[0046] 上記のジアゾール誘導体ではあれば特に限定されないが、以下の一般式で表されるオキサジアゾロピリジン誘導体を好適に用いることができる。

[化13]



[0047] オキサゾロピリジン誘導体は、そのカルボン酸誘導体を合成後、例えば、以下のスキーム2に示す反応により、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を縮合剤として用い、N-ヒドロキシースクシンイミドエステルを含む活性エステル体へ誘導したものをを用いることができる。

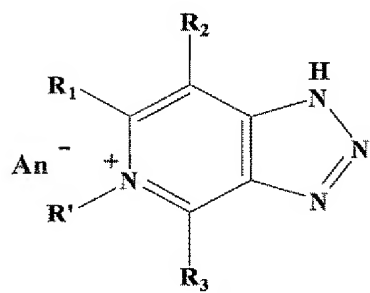
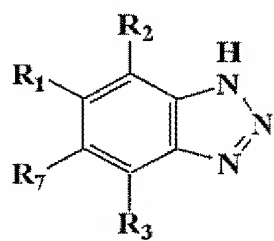
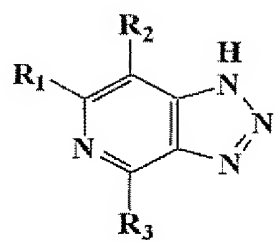
[0048] [化14]



スキーム2.

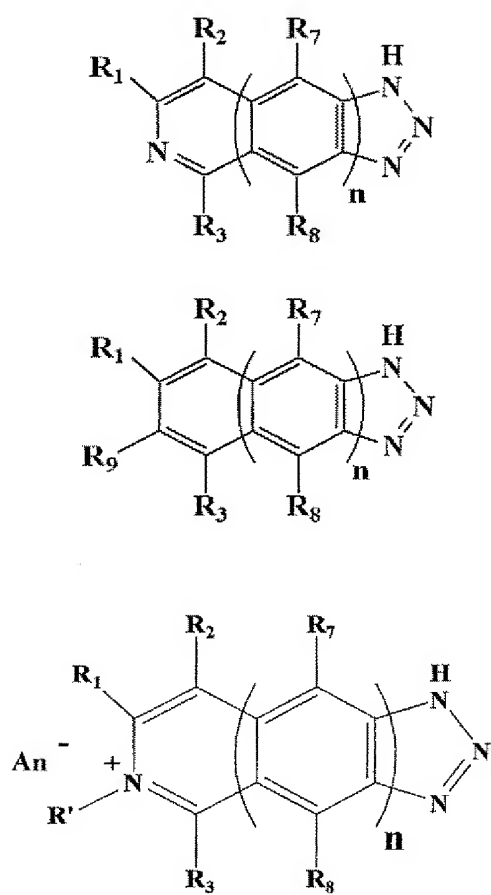
[0049] (トリアゾール誘導体1)

[化15]



[0050] (トリアゾール誘導体2)

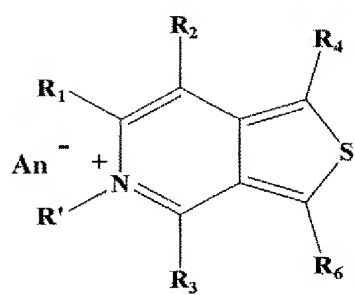
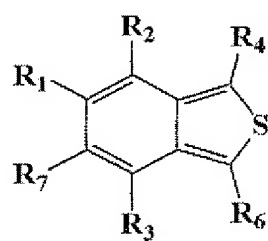
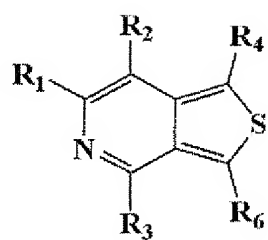
[化16]



[0051] 5員環化合物として、チオフエン基を含む以下の誘導体を用いることもできる。

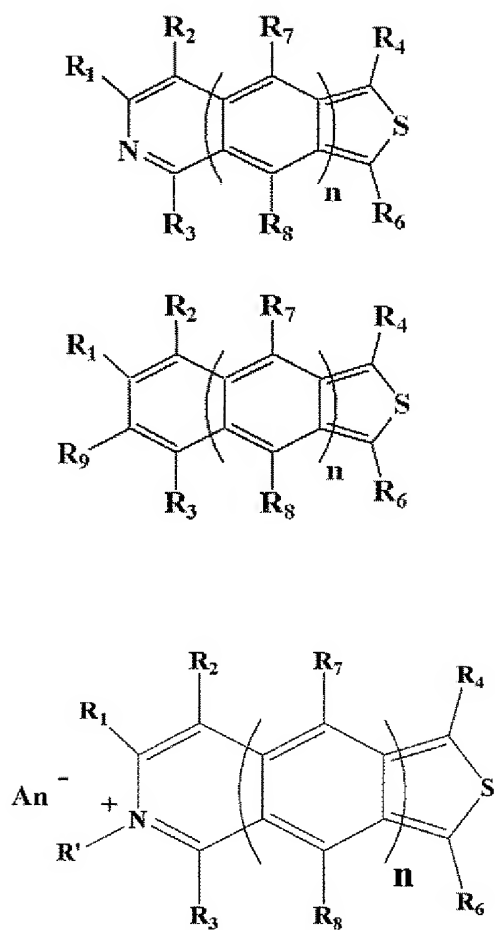
(チオフエン誘導体1)

[化17]



[0052] (チオフェン誘導体2)

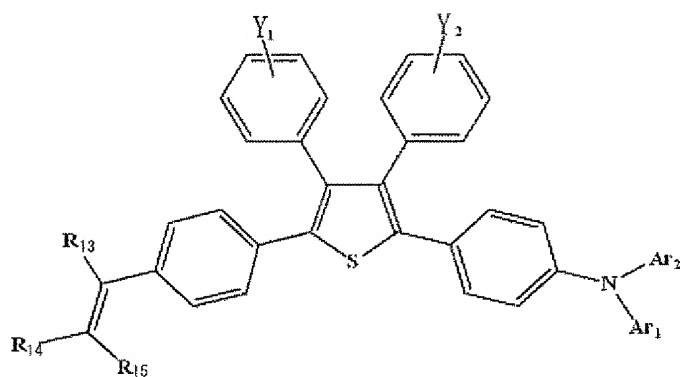
[化18]



[0053] (チオフエン誘導体3)

また、チオフエン誘導体の場合、非縮合系の化合物であり、以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフエン誘導体を用いることもできる。

[0054] [化19]



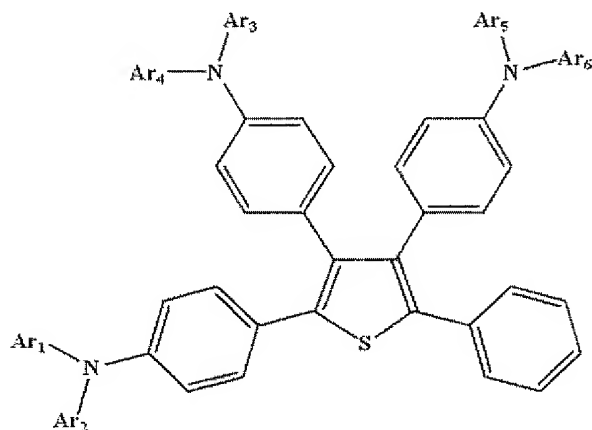
[0055] ここで、式中、 R_{13} , R_{14} , R_{15} はそれぞれ独立に、水素原子、直鎖、分岐または環状のア

ルキル基、置換または未置換のアリール基、あるいは置換または未置換のアラルキル基を表し、 Ar_1 および Ar_2 は置換または未置換のアリール基を表し、さらに、 Ar_1 と Ar_2 は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成してもよい。また、 Y_1 および Y_2 は水素原子、ハロゲン原子、直鎖、分岐または環状のアルキル基、直鎖、分岐または環状のアルコキシ基、置換または未置換のアリール基、置換または未置換のアラルキル基、あるいは置換または未置換のアミノ基を表す。

[0056] (チオフェン誘導体4)

また、以下の一般式で示される2,3,4,5-テトラフェニルチオフェン誘導体を用いることもできる。

[0057] [化20]

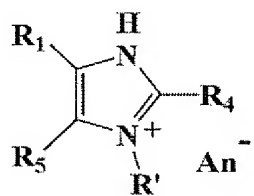


[0058] ここで、式中、 Ar_1 — Ar_6 はそれぞれ独立に、置換または未置換のアリール基を表し、さらに、 Ar_1 と Ar_2 、 Ar_3 と Ar_4 および Ar_5 と Ar_6 は結合している窒素原子と共に含窒素複素環を形成していても良い。

[0059] また、5員環化合物にイミダゾールを用い、以下の一般式で示すイミダゾール誘導体を用いることもできる。ここで、イミダゾール誘導体を構成するイミダゾール基は4級アンモニウム基を有することが好ましい。水溶性を向上させることができるからである。さらに、ピリジノ基を含む場合、より水溶性を向上させるために、ピリジノ基も4級アンモニウム基を有していても良い。なお、以下の一般式中、 R' は芳香環を含んでも良いアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基を示す。

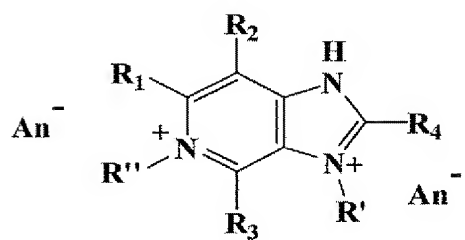
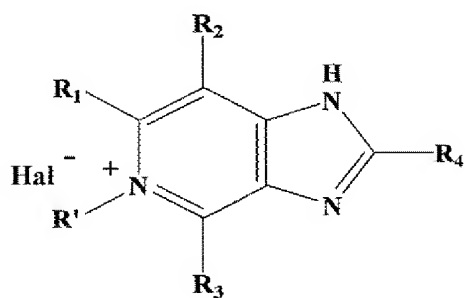
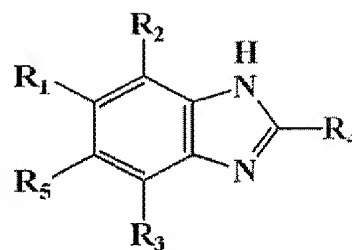
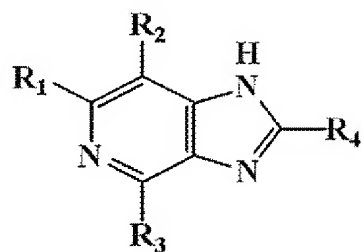
[0060] (イミダゾール誘導体1)

[化21]



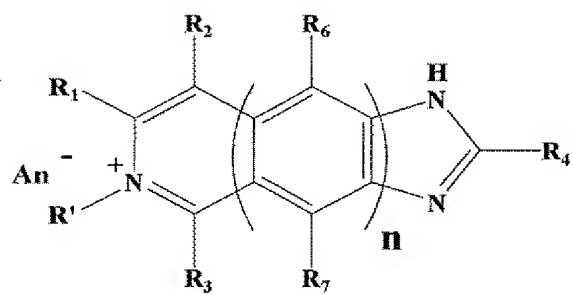
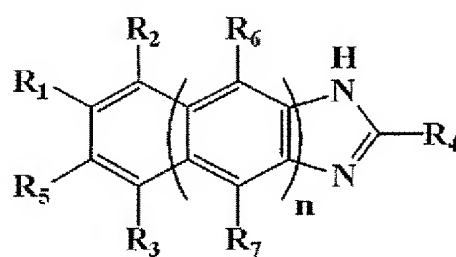
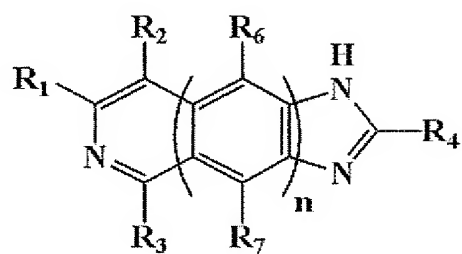
[0061] (イミダゾール誘導体1)

[化22]



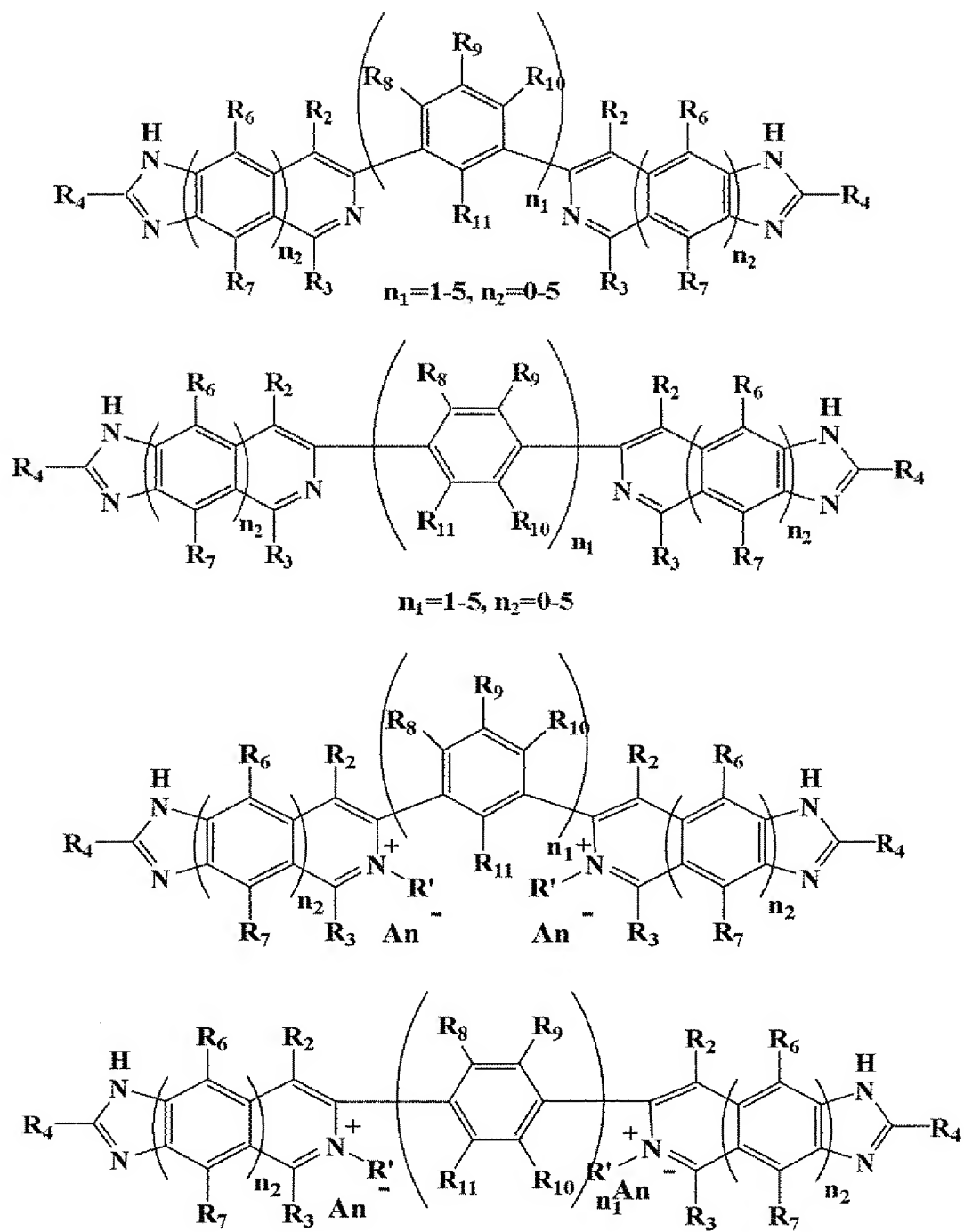
[0062] (イミダゾール誘導体2)

[化23]

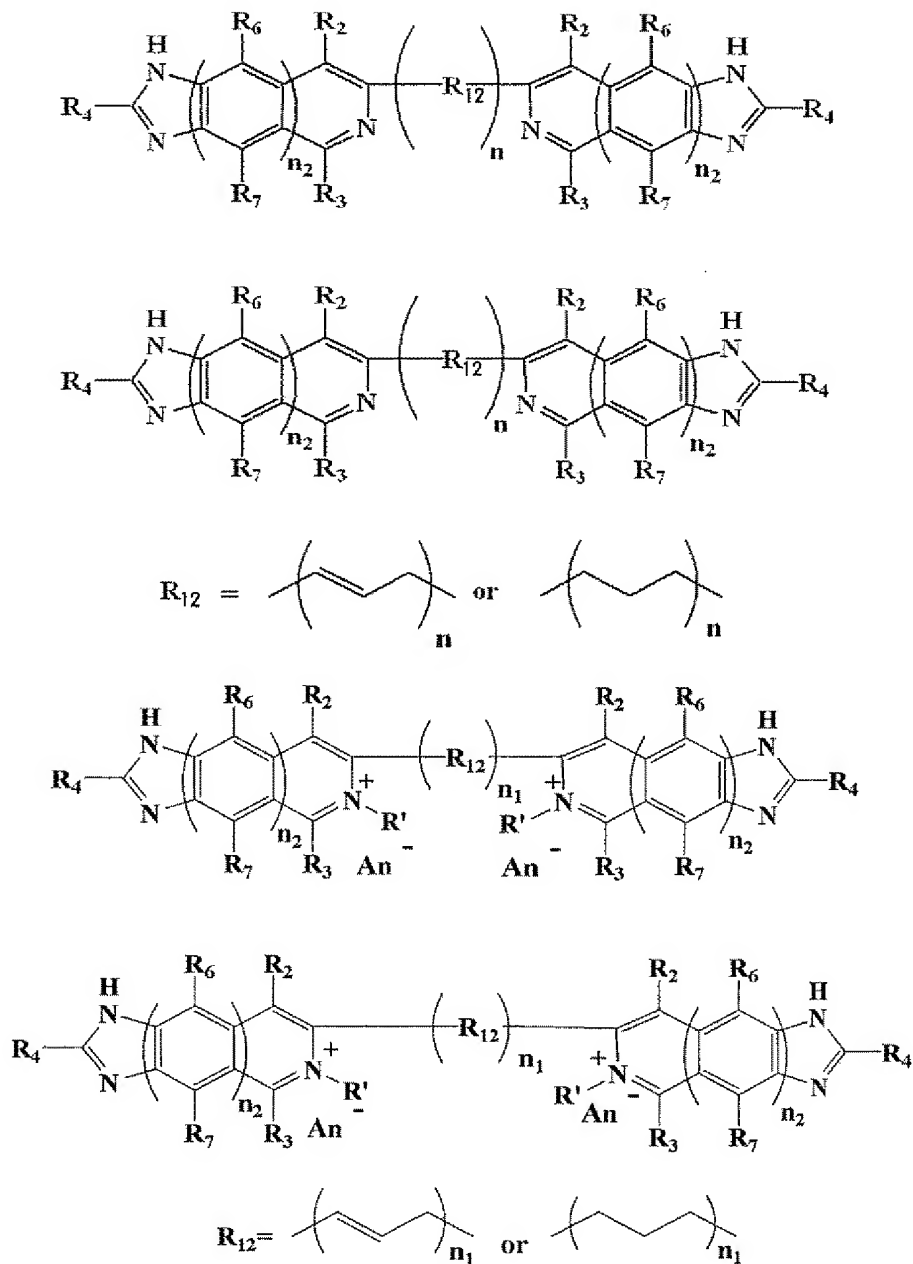


[0063] (イミダゾール誘導体3)

[化24-1]



[0064] [化24-2]

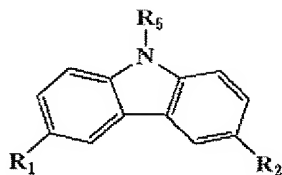


[0065] ここで、イミダゾール骨格は中央のベンゼン環R₈, R₉, R₁₀, R₁₁の任意の位置に複数ユニットが結合していても良い。また、R₁₂は、置換基を有してもよいオレフィン基又はパラフィン基であり、nは1から3の整数、好ましくは1である。

[0066] (カルバゾール誘導体)

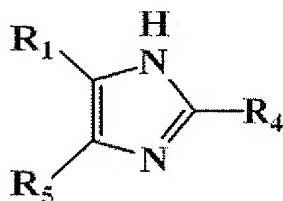
また、以下の一般式で示されるカルバゾール誘導体を用いることもできる。

[0067] [化25]



[0068] また、共役系を有する5員環化合物であって、1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む単環化合物を用いることもできる。特に限定されないが、例えば、以下の一般式で表されるアゾール誘導体を用いることができる。

[0069] [化26]



[0070] ここで、式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示す。 R_1 、 R_4 、 R_5 は同じでも異なってもよい。

[0071] 本発明の検出方法は、標識された固体あるいは半固体状態の生体分子の蛍光を測定する検出方法であれば、あらゆる生体分子の検出方法に適用することができる。従来の蛍光色素に代えて有機EL色素を用いることにより、高感度で、化学的に安定で操作性に優れ、さらに低コストの検出方法を提供することができる。本発明においては、前述のように生体分子試料に有機EL色素を直接反応させて、生体分子試料を有機EL色素で標識しても良く、あるいは生体分子試料と、有機EL色素で標識されたプローブとを反応させて生体分子試料を有機EL色素で標識する方法を用いることもできる。さらに、有機EL色素で標識した生体分子試料を電気泳動によりサイズ分離する方法を用いることもできる。

[0072] 例えば、核酸を検出対象とするDNAマイクロアレイ法では、以下の手順で行うことができる。

(DNAマイクロアレイ法)

本検出方法は、検出すべき標的核酸に有機EL色素を反応させて有機EL色素で標識する一方、標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖のプローブ核酸を用意し、一本鎖に変成させた標的核酸とプローブ核酸とを基板上でハイブリダイズさせ、標的核酸の蛍光を測定する。本検出方法では、基板に固定するプローブ核酸には、遺伝子の発現を調べる場合、cDNA等をcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリー又は全ゲノムをテンプレートとしてPCR法により増幅して調製したものを用いることができる。また、遺伝子の変異等を調べる場合、標準となる既知の配列をもとにして、変異等に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成したものを用いることができる。

[0073] プローブ核酸の基板上への固定は、核酸の種類や基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる。例えば、DNAの荷電を利用し、ポリリシン等の陽イオンで表面処理した基板に静電結合させる方法を用いることもできる。一方、一本鎖に変成させた標的核酸と有機EL色素とを混合して反応させることにより、有機EL色素により標識された標的核酸を調製する。反応温度は室温〜60℃、反応時間は2〜48時間で行うことが好ましい。

[0074] 次いで、標識された標的核酸を基板上にスポットし、ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、室温〜70℃、そして2〜48時間の範囲で行うことが好ましい。ハイブリダイゼーションにより、プローブ核酸と相補的な塩基配列を有する標的核酸が選択的にプローブ核酸と結合する。その後、基板を洗浄して、室温で乾燥する。次いで、乾燥した基板の表面の蛍光強度を蛍光レーザスキャナ法により測定する。蛍光強度により、遺伝子発現のレベルをモニタリングすることができる。なお、上記のハイブリダイゼーションは、プローブ核酸を基板に固定する方法について説明したが、予め有機EL色素で標識した標的核酸を基板に固定し、プローブ核酸を基板上にスポットする方法を用いることもできる。

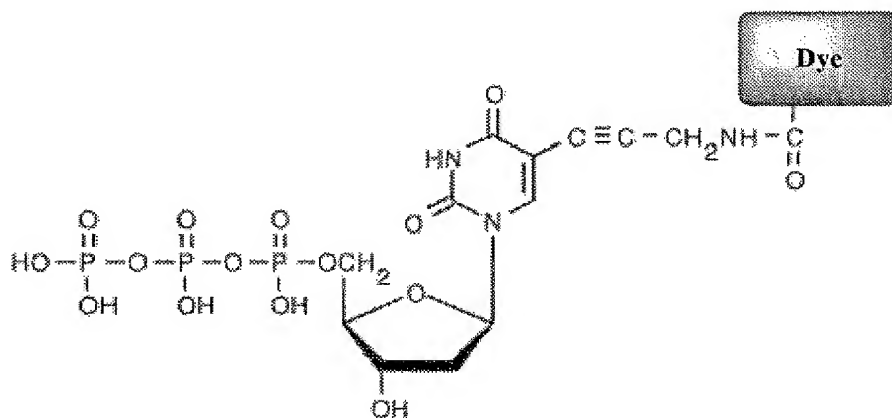
[0075] また、同様に核酸を検出対象とし、プライマーやターミネータを用いるPCR法では、以下の手順で行うことができる。

(PCR法)

(PCR法)

本検出方法は、検出すべき標的核酸の塩基配列に相補的なプローブを有機EL色素で標識し、標的核酸の増幅に先立って、あるいは増幅させた後、標的核酸とプローブとを反応させ、標的核酸の蛍光を測定する。具体的には、標的核酸の伸長反応は酵素(DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ)によって行われ、このとき標的核酸とオリゴヌクレオチドからなるプライマーとが形成した2本鎖核酸配列を酵素が認識し、その認識した位置から伸長反応が行われ、目的とする遺伝子領域だけを増幅させる。酵素が合成を行う際ヌクレオチド(dNTP、NTP)を原料として合成反応が行われる。このとき通常のヌクレオチド(dNTP、NTP)に、例えば、図27に示すような、色素を有するヌクレオチドを任意の割合で混合すると、その割合の色素が導入された核酸を合成することができる。または、PCRにより、任意の割合でアミノ基を有するヌクレオチドを導入した後、有機EL色素を結合させ、有機EL色素が導入された核酸を合成することも可能である。

[0076] [化27]



[0077] 酵素が合成を行う際ヌクレオチドを原料に合成反応が行われるが、このときのヌクレオチドの3'のOHをHに変えたものを使用した場合、それ以上核酸の伸長反応が行われず、その時点で反応が終了する。このヌクレオチド、dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP)はターミネータと呼ばれる。通常のヌクレオチドにターミネータを混ぜて核酸の合成反応を行うと、一定確率でターミネータが導入され、反応が終了するため様々な長さの核酸が合成される。これをゲル電気泳動によりサイズ分離を行うと長さの順番ごとにDNAが並ぶことになる。ここで、ターミネータの各塩基の種類ごとに異なる有機EL色素で標識しておくと、合成反応の終点(3'端)には各塩基に依存した傾向が

観察され、ターミネータに標識した有機EL色素を基点に蛍光情報を読み取っていくことで、その標的核酸の塩基配列情報を得ることが出来る。また、ターミネータに代えて、予め有機EL色素で標識したプライマーを用いて標的核酸とハイブリダイズすることもできる。

[0078] また、プローブとしてPNA(ペプチド核酸)を用いることもできる。PNAは、核酸の基本骨格構造である五単糖・リン酸骨格を、グリシンを単位とするポリアミド骨格に置換したもので、核酸によく似た三次元構造を有し、相補的な塩基配列を持つ核酸に対し、非常に特異的かつ強力に結合する。そのため、特定核酸検出のためのプローブとして有効である。そのため、in-situ hybridization 法など既存のDNA解析手法のみならず、テロメアPNAプローブに応用することで、テロメア研究の試薬として用いることも可能である。

[0079] 検出には、例えば、二本鎖DNAを、DNAの塩基配列の全部又は一部に相補的な塩基配列を有し、有機EL色素で標識されたPNAと接触させてハイブリダイズさせ、その混合物を加熱して一本鎖DNAを生成させ、混合物をゆっくりと室温まで冷却させてPNA-DNA複合体を調製し、その蛍光を測定することにより行うことができる。

[0080] 上記の例では、標的核酸をPCR法により増幅させて、生成物の蛍光を測定する方法について説明したが、この方法では、電気泳動で生成物のサイズを確認して、その後蛍光強度を測定することにより増幅生成物の量を調べる必要がある。これに対し、蛍光色素のエネルギー転スファーを利用して、PCR法の生成物にハイブリダイズさせることで蛍光が生じるように工夫されたプローブを用い、リアルタイムで生成物の量を測定することもできる。これには、例えば、ドナーとアクセプターを標識したDNAを用いることができる。具体的な検出方法としては、特定配列の核酸の存在を確認するモレキュラービーコン法やTaqMan-PCR法やサイクリングプローブ法等を挙げることができる。

[0081] 例えば、モレキュラービーコン法の発光機構について図11を用い、基板上にモレキュラービーコンを固定し、目的遺伝子とのハイブリダイゼーションを行う例について説明する。特定のDNA配列を有するDNA(プローブ)の一端に有機EL色素F、他端にクエンチャーQを標識する。クエンチャーQは基板に固定されており、目的遺伝子

導入前では、クエンチャーQと有機EL色素Fとが近接しており蛍光色素は消光される。ここに、標識したDNAと相補的な配列を有する目的遺伝子を導入すると、標識したDNAと目的遺伝子とはハイブリダイゼーションを行うが、これにより有機EL色素FとクエンチャーQの距離が離れ、有機EL色素Fの蛍光を観察することができる。これにより、DNAのハイブリダイゼーションの観察ならびにハイブリダイゼーションの量を測定することが可能となる。

[0082] また、タンパク質を検出対象とする場合、電気泳動後のタンパク質の検出には染色色素が用いられている。通常、泳動後のゲル中に、染色色素、例えばクーマシーブリリアントブルー (CBB) を浸透させてタンパク質を染色し、UVを照射して発光させる方法が用いられる。しかしながら、従来の染色色素を用いる方法は簡便であるが、感度が100ng程度と低く微量のタンパク質の検出には適さない。また、ゲルを介して染色色素を浸透させるため、染色に長時間を要するという問題もある。

[0083] これに対し、本発明では、タンパク質を電気泳動によりサイズ分離した後、分離したタンパク質に有機EL色素を結合させることによりタンパク質を標識する。本発明の有機EL色素は反応性基を有しており、タンパク質と速やかに定量的に反応し、さらに高感度であり、微量タンパク質の検出には好適である。さらに、サイズ分離したタンパク質を質量分析して同定することもできる。

[0084] ここで、タンパク質には、アルブミン、グロブリン、グルテリン、ヒストン、プロタミン、そしてコラーゲン等の単純タンパク質、核タンパク質、糖タンパク質、リボタンパク質、リンタンパク質、金属タンパク質等の複合タンパク質のいずれも検出対象とすることができる。例えば、リンタンパク質、糖タンパク質、総タンパク質の染色色素に対応させて3種の有機EL色素を用い、二次元電気泳動で分離したタンパク質試料において、リンタンパク質、糖タンパク質及び総タンパク質を染色することができる。また、TOF-Mass等の質量分析を行うことにより、タンパク質を同定できるので、特殊なタンパク質を生成させる、ガンやウィルスによる感染症などの疾病の診断や治療に応用することが可能である。また、コラーゲンは、動物の結合組織を構成するタンパク質であり、独特の繊維状構造をとる。すなわち、3本のポリペプチド鎖からなり、そのペプチド鎖が寄り集まって三重鎖を形成する。コラーゲンは、一般に極めて免疫原性が低いタ

ンパク質であり、食品、化粧品、医薬品等の分野で広く利用されている。しかし、コラーゲンのペプチド鎖に蛍光色素を導入しても、従来の蛍光色素ではその安定性が十分とは言えず、より安定な蛍光色素が必要とされている。そこで、コラーゲンを標識する蛍光色素に有機EL色素を用いることにより、安定かつ高感度な検出を行うことが可能となる。

[0085] また、タンパク質と特異的に結合する抗体を有機EL色素で標識することにより、タンパク質を標識することもできる。例えば、図12に示すように、IgG抗体をペプシンで処理するとF(ab')₂と呼ばれるフラグメントが得られる。このフラグメントをジチオスレイトール等で還元するとFab'と呼ばれるフラグメントが得られる。Fab'フラグメントは1つもしくは2つのチオール基(-SH)を有している。このチオール基に対してマレイミド基を作用させて特異的な反応を行うことができる。すなわち、図13に示すように、マレイミド基を導入した有機EL色素をフラグメントのチオール基と反応させることにより、有機EL色素で抗体を標識することができる。この場合、抗体の生理活性(抗原捕捉能)を失うことがない。

[0086] なお、本発明の検出方法は、プローブに、特定の生体分子(特にタンパク質)に特異的に結合するアプタマーを用いることもできる。アプタマーはオリゴ核酸からなり、塩基配列に依存して種々の特徴ある立体構造をとることができるので、その立体構造を介してタンパク質を含むあらゆる生体分子に結合することができる。この性質を利用し、有機EL色素で標識したアプタマーを特定のタンパク質に結合させ、被検出物質との結合によるそのタンパク質の構造変化に伴う蛍光変化から間接的に被検出物質を検出することができる。例えば、蛍光色素で標識したアプタマーを用い、エネルギー転スファアを利用したコカイン検出用バイオセンサが提案されている(J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 4928-4931)。この蛍光色素に代えて、有機EL色素を用いることにより、高感度で取り扱いの容易なバイオセンサを提供することが可能となる。

[0087] また、本発明の検出方法を用いて金属イオンの検出を行うこともできる。体内のDNAやタンパク質などの安定性や高次構造の維持、機能発現、そして生体内のすべての化学反応を司る酵素の活性化など、生体内で起こるあらゆる生命現象に金属イオンは関与している。そのため、生体内での金属イオンの動きをリアルタイムで観察

できる金属イオンセンサは医療分野を初めとしてその重要性が叫ばれている。従来、生体分子に蛍光色素を導入した金属イオンセンサが知られている。例えば、 K^+ イオン存在化において、 K^+ イオン取り込んで特殊な構造をとる配列を有する核酸を利用する金属イオンセンサが提案されている(J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 14286-14287)。エネルギー転スファーを起こす蛍光色素を核酸の両端に導入する。通常は色素間距離があるためエネルギー転スファーは起きない。しかし、 K^+ イオン存在下では核酸が特殊な形をとる結果、蛍光色素がエネルギー転スファーを起こす距離に近接することで、蛍光を観察することができる。また、ペプチドに蛍光色素を導入した亜鉛イオンセンサも提案されている(J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 3053-3054)。これらの従来の蛍光色素に代えて本発明の有機EL色素から成る標識色素を用いることにより、従来に比べ高感度で取り扱いが容易な金属イオンセンサを提供することが可能となる。なお、生体内に存在する金属イオンであれば、すべての金属イオンを検出することが可能である。

[0088] また、本発明の検出方法を用いて、細胞内のシグナル観察を行うこともできる。内部シグナルや環境情報に対する細胞の応答には、イオンから酵素へと多大な分子が関与している。シグナル伝達過程では特殊なプロテインキナーゼが活性化し、特殊な細胞タンパク質のリン酸化を導くことで様々な細胞応答の初期応答を担っていることが知られている。ヌクレオチドの結合と加水分解はこれらの活性に重大な役割を果たしており、ヌクレオチド誘導体を用いることで、シグナル伝達挙動を素早く観察することが出来る。例えば、プロテインキナーゼC(PKC)は細胞膜におけるシグナル伝達において重要な役割を果たしている。この Ca^{2+} 依存セリン/スレオニンプロテインキナーゼはジアシルグリセロールやフォスファティジルセリンの様な膜構成脂質上で活性化され、イオンチャネルや細胞骨格タンパク質に存在するセリンやスレオニンをリン酸化することで膜表面電化を変えシグナル伝達を行っている。これらを生細胞において動的に観察することで細胞のシグナル伝達の観察を行うことができる。

[0089] ここで、ヌクレオチド誘導体は酵素の基質や阻害剤として供給され、孤立性タンパク質の構造と力学の探査、膜結合タンパク酵素の再構成、ミトコンドリアのようなオルガ

ネラ、除膜筋線維のような組織のヌクレオチド結合タンパク質部分に、結合してその調節を行っている。また、最近ではG-タンパク質の阻害剤や活性体のようなシグナル伝達に影響を与える化合物の存在も解ってきている。このヌクレオチド誘導体に本発明の有機EL色素からなる標識色素を導入することで、これらの細胞内シグナル伝達の動的観察を高感度で、かつ取り扱い容易に行うことが可能となる。

[0090] また、本発明の検出方法をRNA 干渉作用 (RNAi) を利用した遺伝子発現状況の観察に用いることもできる。RNAiは、RNAを細胞に導入した時、それと同じ配列を持った遺伝子の発現がノックダウンされる現象である。RNAiは二本鎖RNA (dsRNA) を細胞に導入することにより、標的遺伝子のmRNA を分解し、発現を抑制する。このプロセスでは、はじめに長鎖のdsRNA(double stranded RNA)がリボヌクレアーゼ活性を有するDicerによって21〜23 merの短いsiRNAに切断される。生成したsiRNAは、中間複合体(RNA-induced silencing complex (RISC))によって取り込まれ、この複合体が取り込んだsiRNA のアンチセンス鎖と相補的な配列を持つmRNA の切断を行うことが知られている。この分野でも遺伝子発現状況などを観察するために蛍光色素が用いられている。標識する蛍光色素に有機EL色素を用いることにより、安定かつ高感度な検出を行うことが可能となる。

[0091] 本発明の標識キットは、生体分子を標識する有機EL色素又はその誘導体を含むが、必要により色素を対象とする生体分子と反応させるための、試薬、酵素、溶媒等を含むことができる。対象とする生体分子は、核酸、タンパク質、ペプチド類、又は糖類である。また、有機EL色素は、生体分子のアミノ基と反応する官能基を有する誘導体であることが好ましく、その官能基を例示すると、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種であることが好ましい。さらに好ましくは、トリアジン基、カルボジイミド体又は活性エステル化したカルボニル基を含む活性エステル体を有機EL色素の誘導体として含むことが好ましい。

[0092] 本発明の標識色素は、組織又は細胞試料中の標的核酸や標的タンパク質の発現レベルの検討に用いる組織又は細胞の染色色素としても用いることができる。組織又は細胞の染色は、前述のように反応性基を介して標的核酸あるいは標的タンパク質

に有機EL色素を結合させることにより行うことができる。

[0093] すなわち、本発明の染色色素は、例えば、有機EL色素を真核細胞の染色に用いると、乾燥状態でも蛍光を発することから標識後の保存などの点で従来の色素よりも優れた性能を示す。また、真核細胞のみならず、細胞骨格用色素としても十分に用いることが可能である。この他、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、ソリゾーム、脂質二重膜などの標識に用いることが可能である。これら、標識された細胞等は、湿潤及び乾燥のあらゆる条件下で観測が可能であるため、汎用性が大きい。観測に際しては、蛍光顕微鏡などを用いることができる。

[0094] また、臨床段階で人体より採取された組織は、マイクロームなどの機器を用いて薄膜にスライスした後、染色されている。ここでは、Cy色素及びAlexa色素が用いられている。しかしながら、既存の色素は安定性が非常に悪く、再診断の際には、再びサンプルを作製する必要がある。また、作製されたサンプルは標本として保存することが不可能である。しかし、上記の従来の色素に比べ有機EL色素は、非常に安定な色素であるので、染色した組織を標本として保存することが可能である。

実施例 1

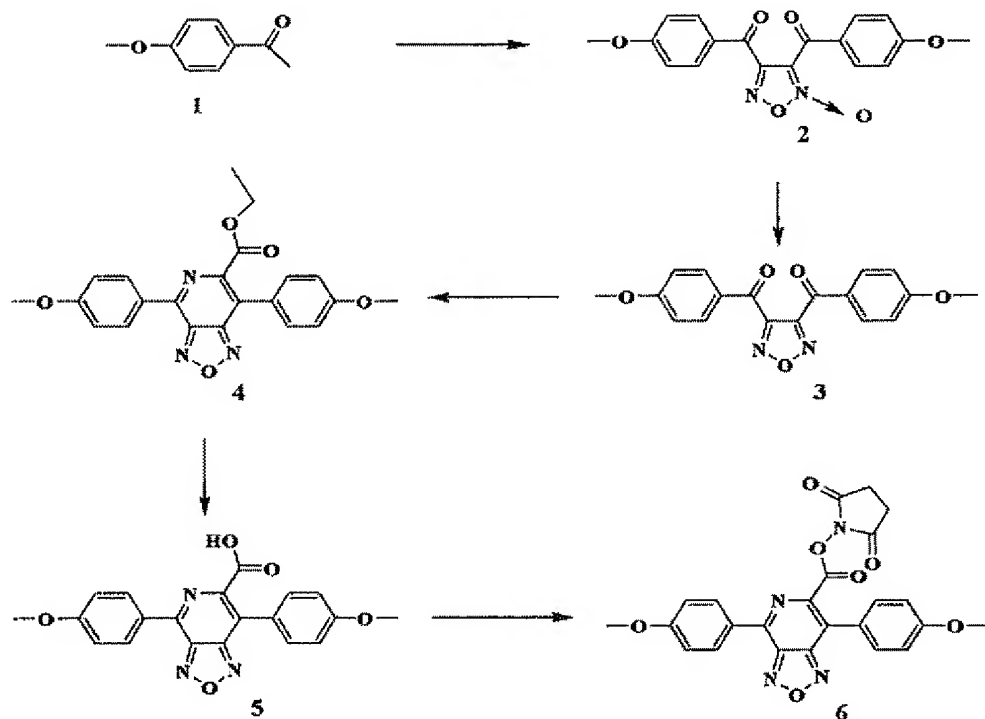
[0095] 以下、実施例を用いてさらに詳細に本発明について説明する。

合成例1.

有機EL色素として1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジン誘導体を用いた。

以下に、1, 2, 5,-オキサジアゾロ-[3, 4-c]ピリジンの活性エステル体(以下、EL-OSuと略す。)の合成スキームを示す。

[0096] [化28]



スキーム3.

[0097] (1)ジケトン誘導体(2)の合成

500mL三口フラスコに4-メトキシアセトフェノン(1)37.5 g (0.25 mol)、亜硝酸ナトリウム 0.15 gを酢酸100 mLに溶解した。水浴中、 HNO_3 100 mLを酢酸100 mLに溶解したものを2時間かけて滴下した。その後、室温で2日間攪拌した。反応混合物を500mLの水にゆっくりと入れ、沈殿を生成させた。沈殿物は濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を飽和重曹水で洗浄し、10% NaCl 水溶液で2回洗浄した。 MgSO_4 で脱水した後、減圧下、クロロホルムを留去し、オキサジアゾール-N-オキサイド(2)を34.5 g (収率78%)で得た。

[0098] (2)ジケトン誘導体(3)の合成

500mL三口フラスコにオキサジアゾール-N-オキサイド(2)17.7 g (0.05 mol)をアセトニトリル400 mLに溶解した。それにZn 12.0 g、AcOH 7 mL、 Ac_2O 20mLを添加した。水浴中で反応温度が30℃を超えないように冷却した。12時間攪拌して反応終点とした。反応混合物を濾過し、不溶分を除去した。アセトニトリルを減圧下留去して残渣を

得た。残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾール-N-オキサイド(3)を10.2 g (収率60%)で得た。

[0099] (3) オキサゾロピリジンエチルエステル(4)の合成

500mL三口フラスコでオキサジアゾール-N-オキサイド(3)15.6 g (0.046 mol)をブタノール300 mLに溶解した。そこへグリシンエチルエステル塩酸塩 32.0 g (0.23 mol)を添加した。24時間加熱還流を行った。ブタノールを減圧下留去し、残渣を得た。残渣を200mLのクロロホルムに溶解し、10% HCl、飽和 NaHCO_3 、10%NaClで洗浄した。 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を留去した。得られた残渣をクロロホルムで再結晶し、オキサジアゾロピリジンエチルエステル(4)を13.0 g (収率 70%)で得た。

[0100] (4) オキサゾロピリジンエチルエステル(4)の加水分解

500mL三口フラスコでオキサジアゾロピリジンエチルエステル(4)3.0 g (0.007 mol)を200 mLのエタノールに溶解した。そこへKOH 0.62 g (0.01 mol)を添加した。5時間加熱還流を行った後、反応混合物を200 mLの水へ添加した。この水溶液に濃塩酸を滴下してpH 1に調整したところ沈殿が生じた。沈殿物を濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を10% NaHCO_3 水溶液、水で洗浄した。クロロホルムを留去して残渣を得た。残渣を水-エタノール (1:1)で再結晶し、2.1 g (収率 81%)のオキサジアゾロピリジンカルボン酸(5)を得た。

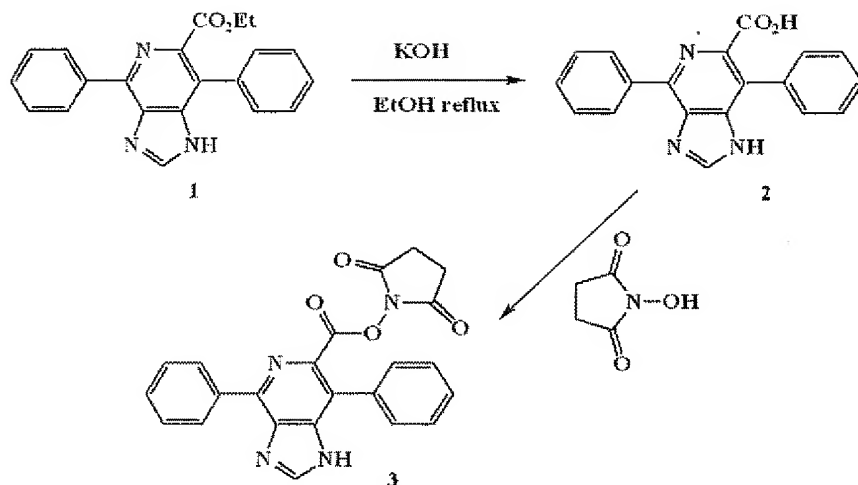
[0101] 活性エステル(6)の合成

50 mL 三口フラスコでオキサジアゾロピリジンカルボン酸(5)1.0 g (0.0026 mol)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.30 g (0.0026 mol)をDMF 20mLに溶解した。これにN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.54 g (0.0026 mol)を30分かけて滴下した。滴下後、室温で30時間攪拌した。減圧下、DMFを留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)で単離精製し、オキサジアゾロピリジン活性エステル体(6)を0.76 g (収率62%)得た。

[0102] 合成例2.

有機EL色素としてイミダゾロピリジンエチルエステル誘導体を用いた。以下に、イミダゾロピリジンエチルエステルの活性エステル体(以下、im-EL-OSuと略す。)の合成スキームを示す。

[0103] [化29]



[0104] (1) イミダゾピリジンエチルエステル(1)の加水分解

500mL三口フラスコでエステル体1 0.5 g (1.5 mmol)を50 mLのエタノールに溶解した。そこへKOH 0.12 g (2.1 mol)を添加した。5時間加熱環流を行った後、反応混合物を50 mLの水へ添加した。この水溶液に濃塩酸を滴下してpH 1に調整したところ沈殿が生じた。沈殿物を濾過し、クロロホルムに溶解した。クロロホルム相を10% NaHCO₃水溶液、水で洗浄した。クロロホルムを留去して残渣を得た。残渣を水で再結晶し、0.3 g (収率 63%)のカルボン酸 2 を得た。

[0105] (2) 活性エステル(3)の合成

50 mL 三口フラスコでカルボン酸誘導体2 0.2 g (0.6 mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド0.07 g (0.6 mmol)をDMF 10mLに溶解した。これにN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 0.12 g (0.6 mmol)を30分かけて滴下した。滴下後、室温で30時間攪拌した。減圧下、DMFを留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)で単離精製し、活性エステル体3を0.14 g (収率55%)得た。

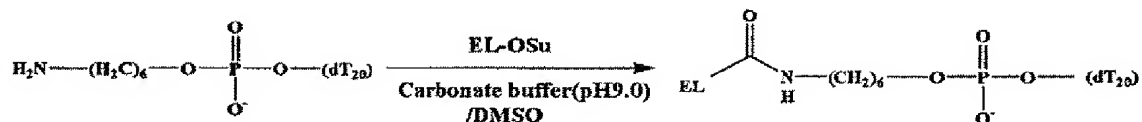
[0106] 実施例1.

〈オリゴヌクレオチドの色素標識及び検出(1)〉

1. オリゴヌクレオチドの色素標識

オリゴヌクレオチドの色素標識は、以下のスキーム4で行った。

[0107] [化30]



スキーム4.

[0108] (実験操作)

H₂N-dT₂₀(40 mmol)を含むNa₂CO₃/NaHCO₃ buffer(pH 9.0)40 μlに、有機EL色素の活性エステル5.0 μmol(2.4 mg)を含む無水 DMSO溶液12 μlを加えて室温で6時間振とうした。振とう後、全量が1mlになるように0.1M TEAA(triethylamine-acetic acid)buffer(pH7.0)を加え、NAP-10カラム(Parmacia SephadexG-25)を用いてオリゴヌクレオチドに由来する成分を分取した。その際、NAP-10カラムはあらかじめ0.1M TEAA buffer 15mlで平衡化させた後使用した。全量が1mlになるようにメスアップした試料をカラムに充填し、1mlの溶液が溶出した後、0.1M TEAA bufferを1.5mlチャージした。この直後からの溶出液1.5mlを分取した。この得られた溶液を一晩凍結乾燥し、滅菌蒸留水20 μlを加えて逆相HPLCにより分析した。HPLCにインジェクトした溶液は、40分の1に希釈して分析した。

[0109] (HPLC測定条件)

カラム:Lichrospher RP-18(Cica-MERCK) 流速:1ml/min

検出波長:260nm 試料注入溶媒:超純水

溶離液A:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 10% CH₃CN溶液溶離液B:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 40% CH₃CN溶液

[表1]

	0	30	35	40 (min)
A	100	0	0	100 (%)
B	0	100	100	0 (%)

HPLC測定のグラジエント条件

[0110] 標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルと目的物のUVスペクトルをそれぞれ図1Aと図1Bに示す。HPLCの結果、RT=30 min付近に目的物由来のピークが得ら

れたと判断し、HPLC分取を行った。得られた目的物の同定は、MALDI TOF MASSにより行った。その結果を図2に示す。HPLCクロマトグラムのピーク面積から反応率を算出した結果、約90%であり、ほぼ定量的にEL色素の活性エステル(6)がオリゴDNAと反応した。

[0111] 2. 標識されたオリゴヌクレオチドの検出

次に、以下の表2に示すように、標識されたオリゴヌクレオチドの濃度の異なる溶液を調製した。次いで、その溶液1nLをガラス基板上にスポット(5×5)した。スポット後、ガラス基板を乾燥した。

[表2]

溶液濃度 (μ M)	標識されたオリゴヌクレオチド の相対濃度(fmol)
110	110
11	11
1	1
0.5	0.5

[0112] 次に、蛍光スキャナーでその検出限界を調べた。結果を図3に示す。(a)、(b)、(c)、(d)は、それぞれ110fmol、10fmol、1fmol、0.5fmolの結果を示す。

ここで、検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメジャー FX Proを用いた。レーザの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

[0113] (結果)

今回、検出に用いた励起光は488 nmのレーザ光であり、蛍光色素の励起波長は438 nmである。それにも拘わらず、標識されたオリゴヌクレオチドの相対濃度の検出限界は0.5 fmol (500 amol)であり高感度な検出が可能であった。また、DNAとの反応はほぼ定量的であり、反応時間も従来の24時間程度から6時間程度に短縮することが可能であった。さらに、このEL色素は安定であり、15日間、室温下で保存したEL色素を用いて再測定しても、同等の結果が得られた。

[0114] 実施例2.

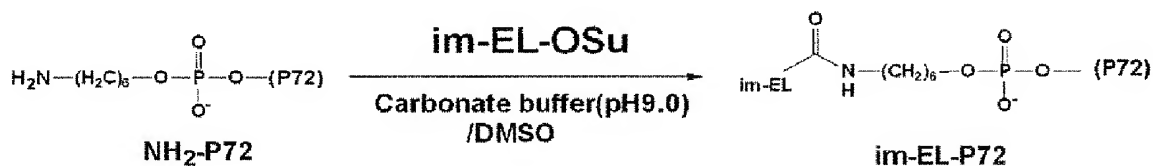
〈オリゴヌクレオチドの色素標識及び検出(2)〉

1. オリゴヌクレオチドの色素標識

オリゴヌクレオチドの色素標識は、以下のスキーム4で行った。標識の条件は実施

例1の場合と同様である。イミダゾール誘導体の付加反応は速やかに且つほぼ定量的に進行した。

[0115] [化31]



スキーム5.

[0116] (HPLC測定条件)

カラム:Lichrospher RP-18(Cica-MERCK) 流速:1ml/min

検出波長:260nm 試料注入溶媒:超純水

溶離液A:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 10% CH₃CN溶液

溶離液B:0.1M TEAA buffer(pH7.0), 40% CH₃CN溶液

なお、HPLC測定のグラジエント条件は実施例1の場合と同様である。標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCスペクトルと目的物のUVスペクトルをそれぞれ図4Aと図4Bに示す。HPLCの結果、RT=25 min付近に目的物由来のピークが得られたと判断し、HPLC分取を行った。

[0117] 次に、実施例と同様にして蛍光スキャナーでその検出限界を調べた。結果を図5に示す。ここで、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)はそれぞれ500 fmol, 250 fmol, 100 fmol, 50 fmol, 10 fmolにおける発光パターンを示す。

[0118] (結果)

標識されたオリゴヌクレオチドの相対濃度の検出限界は10fmolであり高感度な検出が可能であった。また、オリゴヌクレオチドとEL色素との反応はほぼ定量的であった。

[0119] 実施例3.

〈ペプチド類の標識及び検出〉

1. Ac-Lys(EL)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-Lys(Acr)-Lys-Lys-NH₂の合成

(1) Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Lys(Acr)-(Lys(Boc))₂-Resinの合成

(実験操作)

リアクションベッセルにFmoc-NH-SAL Resin 0.15g(0.61mmol/g)を入れ、カートリッジ3, 6にFmoc-Lys(Acr)-OHを0.26gずつ、カートリッジ1,2,4,5,7,8にFmoc-Lys(Boc)-OHを0.18gずつ、カートリッジ9にFmoc-Lys(Mtt)-OHを0.23g入れた。後は、Applied Biosystems社の431A peptide synthesizerを用いて合成を行った。Methodは、standard Fmoc法で行い、N末端はアセチル化した。黄色固体のペプチドレジンが得られ、収量は0.30gであった。

[0120] (2) $\text{Ac-Lys(Mtt)-(Lys(Boc))}_2\text{-Lys(Acr)-(Lys(Boc))}_2\text{-Lys(Acr)-(Lys(Boc))}_2\text{-Resin}$ のMtt基の脱保護、ELの修飾及びレジンからの切り出し、及び側鎖の脱保護
(実験操作)

i) Mtt基の脱保護

スクリー管に1で合成したペプチドレジン0.30g入れ、これに過剰のジクロロメタン(DCM)を加えて30分かけて膨潤させた後、過剰のDCMを窒素ガスで除いた。その後、DCM:TFA:TIPS(トリイソプロピルシラン)=94:1:5の混合溶液4mlを加えて2分攪拌し、窒素ガスで溶媒を除いた。この操作を5回繰り返した後、吸引濾過しDCM、トリエチルアミン、DCMで洗浄後、減圧乾燥させた。

ii) メキシ型有機EL色素の修飾

減圧乾燥させたペプチドレジンにNMP 6mlを加えて30分間攪拌して膨潤させ、トリエチルアミン 0.15mlを加えて攪拌した。さらに、活性エステル(6) 0.2gを加えて室温で24時間攪拌した。その後吸引濾過し、NMP、DCMで洗浄して減圧乾燥させた。

iii) レジンからの切り出し及び側鎖の脱保護

減圧乾燥させたペプチドレジンにm-クレゾール 0.08ml、チオアニソール 0.48ml、TFA 3.44mlを加えて室温で1時間半攪拌した。その後、吸引濾過しTFAで洗浄した。TFAを減圧留去した後、氷浴中でエーテル15ml加えた。超音波処理後、しばらく放置し、上澄み液を取り除いた。次に、氷浴中で酢酸エチル15mlを加えて、超音波処理後、しばらく放置した。その後、吸引濾過しエーテルで洗浄後、減圧乾燥させた。

[0121] 黄橙色固体が得られ、収量は0.29gであった。図6Aと図6Bに、それぞれ生成物の精製前と精製後のHPLCスペクトルを示す。R.T.=12.5min付近のピークのサンプルについてTOF-Mass測定を行ったところEL色素とペプチドの複合体(EL-Peptide)の分

子量:2055.30に対応するピークが2057.33に観測され、目的物の生成を確認した。(Matrix: α -CHCA; 図7)

[0122] 2. ペプチドの検出

実施例1と同様の方法により、ガラス基板上にスポットした標識ペプチドの検出を行った。検出機器には、BIO-RAD モレキュラーイメージャー FX Proを用いた。レーザーの波長は488 nm、スキャン間隔は50nmである。

[0123] (結果)

図8は標識されたペプチドの発光パターンであり、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、それぞれ10fmol、5fmol、1fmol、0.5fmol、0.1fmolの結果を示す。標識されたペプチドの相対濃度の検出限界は0.1 fmol (100 amol) であり高感度な検出が可能であった。また、ペプチドとEL色素との反応はほぼ定量的であった。

[0124] 実施例4.

〈タンパク質の色素標識及び検出〉

1. タンパク質の色素標識

BSAのリジン残基のアミノ基と有機EL色素の活性エステルを反応させてアミド結合を形成させて、BSAの標識化を行った。具体的には、BSA (Bovine Serum Albumin) 4.0 mg(58 nmol)を含む炭酸buffer(pH9.0) 58 μ lに、有機EL色素の活性エステル (EL-OSu)3.6 mg(8.6 μ mol)を含むDMSO溶液40 μ l加えて37°Cで24時間振盪した。その後全量が1 mlになるように0.1 M TEAA buffer(pH7.0)を加え、NAP-10カラム (Pharmacia SephadexG-25)を用いてBSAに由来する成分を分取し、分取した溶液を一晚凍結乾燥した。

[0125] MALDI TOF MSにより、有機EL色素を標識化したBSAの同定を行った。図9に示すように、標識化したBSA(図9B)は原料(図9A)に比べ、分子量が2200程増加しており、有機EL色素が約5個結合していることがわかった。

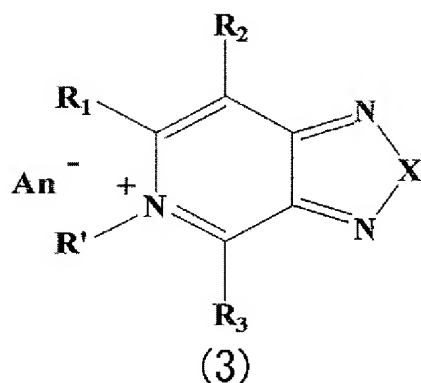
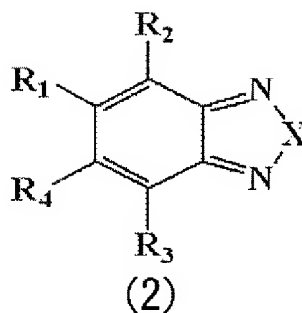
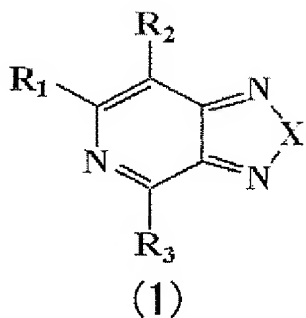
[0126] 2. タンパク質の検出

(結果)

調製したBSAは、図10に示すように固体状態で蛍光を発した。このように有機EL色素活性エステルにより、タンパク質を標識化できることが明らかとなった。

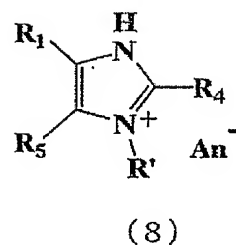
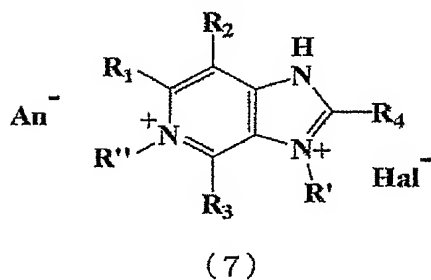
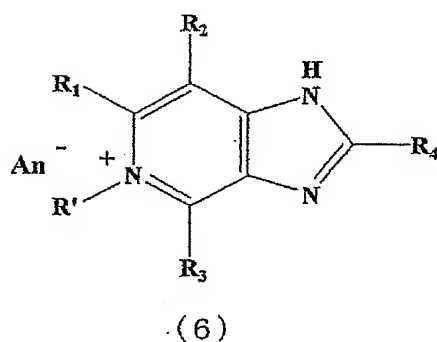
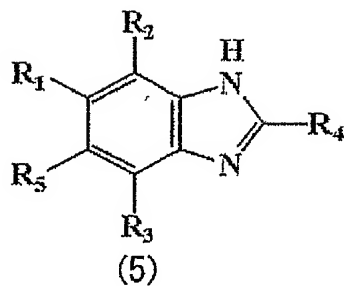
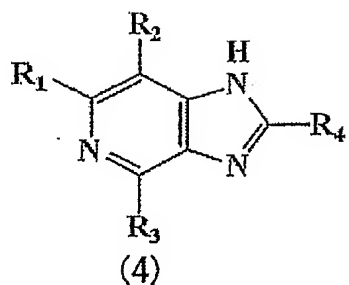
請求の範囲

- [1] 生体分子試料と有機EL色素とを反応させ、該有機EL色素で標識された該生体分子試料の蛍光を測定する生体分子の検出方法。
- [2] 上記有機EL色素と上記生体分子との間に、アミド結合、イミド結合、ウレタン結合、エステル結合又はグアニジン結合を形成させる請求項1記載の検出方法。
- [3] 上記生体分子と反応させるに先立って、上記有機EL色素に、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の反応性基を導入する請求項2記載の検出方法。
- [4] 上記生体分子試料に、核酸、タンパク質、ペプチド類、そして糖類からなる群から選択されたいずれか1種を用いる請求項1記載の検出方法。
- [5] 共役系を有し、1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む5員環化合物、を含む標識色素を用いて生体分子試料を標識し、その標識された生体分子試料の蛍光を測定する生体分子の検出方法。
- [6] 上記標識色素が、上記5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物を含む請求項5記載の検出方法。
- [7] 上記縮合多環化合物が、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体である請求項5記載の検出方法。
- [8] 上記アゾール誘導体が、以下の一般式(1)、(2)又は(3)のいずれか1種で示される化合物である請求項7記載の検出方法。



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有してもよい芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、Xは置換基を有していてもよい窒素原子又は硫黄原子又は酸素原子又はセレン原子を示し、 R' は芳香環を含んでもよいアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基、 An^- は、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等のハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 PF_6^- を示す。)

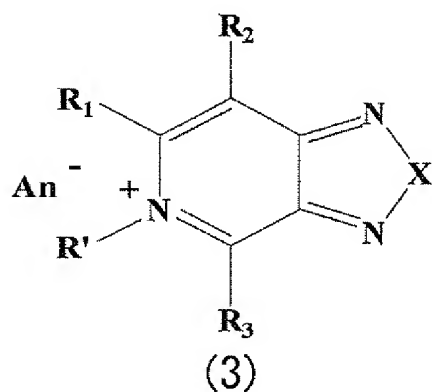
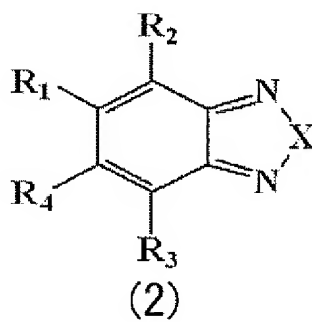
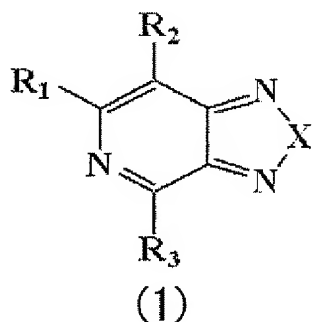
- [9] 上記イミダゾール誘導体が、以下の一般式(4)、(5)、(6)、(7)又は(8)のいずれか一種で表される化合物である請求項7記載の検出方法。



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は同じでも異なっても良く、 R' 、 R'' は芳香環を含んでも良いアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基、 An^- は、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等のハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 PF_6^- を示す。)

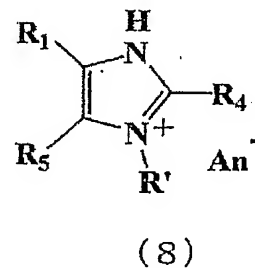
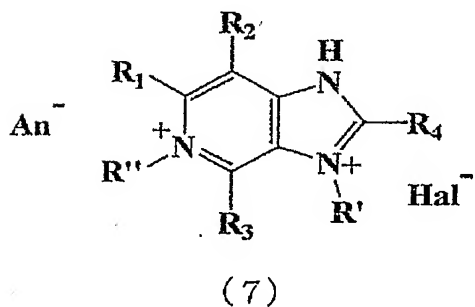
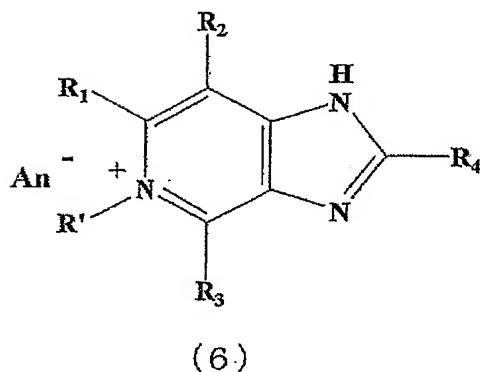
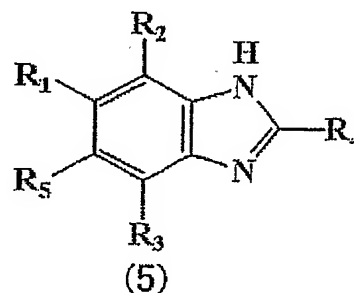
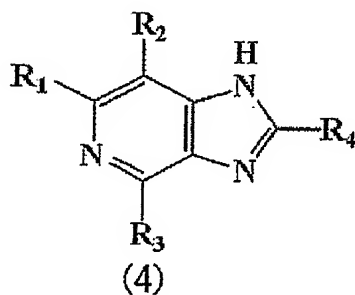
- [10] 上記生体分子と反応させるに先立って、上記標識色素に、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の反応性基を導入する請求項5記載の検出方法。

- [11] 蛍光測定による生体分子の検出に用いる標識色素であって、生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成る標識色素。
- [12] 上記反応性基が、カルボン酸基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種である請求項11記載の標識色素。
- [13] 上記有機EL色素が、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、該5員環化合物は1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む請求項11記載の標識色素。
- [14] 上記有機EL色素が、上記5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物である請求項13記載の標識色素。
- [15] 上記縮合多環化合物が、アゾール誘導体又はイミダゾール誘導体である請求項13記載の標識色素。
- [16] 上記アゾール誘導体が、以下の一般式(1)、(2)又は(3)のいずれか1種で示される化合物である請求項15記載の標識色素。



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有してもよい芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、Xは置換基を有していてもよい窒素原子又は硫黄原子又は酸素原子又はセレン原子を示し、 R' は芳香環を含んでも良いアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基、 An^- は、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等のハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 PF_6^- を示す。)

[17] 上記イミダゾール誘導体が、以下の一般式(4)、(5)、(6)、(7)又は(8)のいずれか1種で表される化合物である請求項15記載の標識色素。



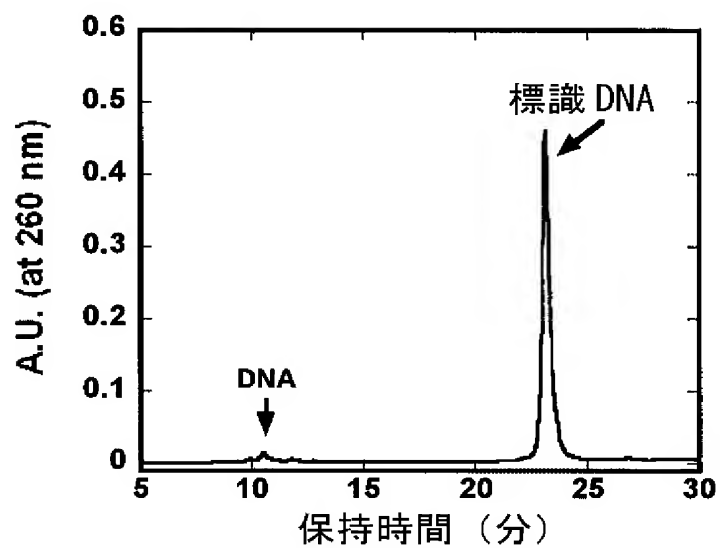
(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は、それぞれ、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、あるいはスルホニル基などの置換基を有しても良い芳香族炭化水素基又は炭化水素基又は複素環基又はヘテロ原子を環内に含む芳香族基を示し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は同じでも異なっても良く、 R' 、 R'' は芳香環を含んでも良いアルキル基又はアルケニル基等の脂肪族炭化水素基あるいは芳香族炭化水素基、 An^- は、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等のハロゲン化物イオン、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 PF_6^- を示す。)

- [18] 生体分子を標識する有機EL色素を含む生体分子用標識キット。
- [19] 上記有機EL色素が、カルボン酸基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、ハロゲン化アルキル基、トリアジン基、カルボジイミド基、そして活性エステル化したカルボニル基から選択されたいずれか1種の反応性基を有する請求項18記載の標識キット。
- [20] 上記有機EL色素が、共役系を有する5員環化合物を含む化合物であって、該5員環化合物は1種以上のヘテロ原子、セレン原子又はボロン原子を含む請求項18記載の標識キット。
- [21] 上記有機EL色素が、上記5員環化合物と共役系を有する6員環化合物とから成る縮合多環化合物である請求項18記載の標識キット。
- [22] 生体分子試料と、有機EL色素で標識されたプローブとを反応させ、該生体分子試料の蛍光を測定する生体分子の検出方法。
- [23] 上記生体分子試料が核酸であり、上記プローブには該核酸の塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチド又はPNAを用いる請求項22記載の検出方法。
- [24] 上記オリゴヌクレオチドがプライマー又はターミネータであり、上記核酸を増幅させて蛍光を測定する請求項23記載の検出方法。
- [25] 上記核酸を増幅に先立ってプライマーを有機EL色素で標識する請求項24記載の検出方法。
- [26] 上記オリゴヌクレオチド又はPNAがモレキュラービーコンである請求項23記載の検出方法。
- [27] 生体分子試料を電気泳動によりサイズ分離する工程を含み、該電気泳動に先立ってあるいは該電気泳動後に生体分子試料を有機EL色素で標識する生体分子の検

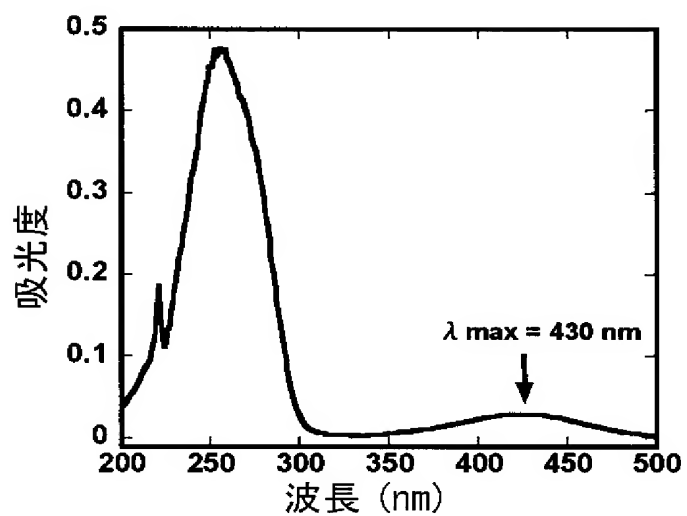
出方法。

- [28] 上記生体分子試料が核酸であり、電気泳動画像に基づいて該核酸の塩基配列を決定する請求項27記載の検出方法。
- [29] 上記生体分子試料がタンパク質であり、電気泳動画像に基づいて取り出したタンパク質を質量分析する請求項27記載の検出方法。
- [30] 組織又は細胞試料中の生体分子を有機EL色素で標識する組織又は細胞の染色方法。
- [31] 上記生体分子が核酸又はタンパク質である請求項30記載の染色方法。
- [32] 組織又は細胞試料の染色に用いる染色色素であって、組織又は細胞中の生体分子と結合する反応性基を有する有機EL色素から成る染色色素。

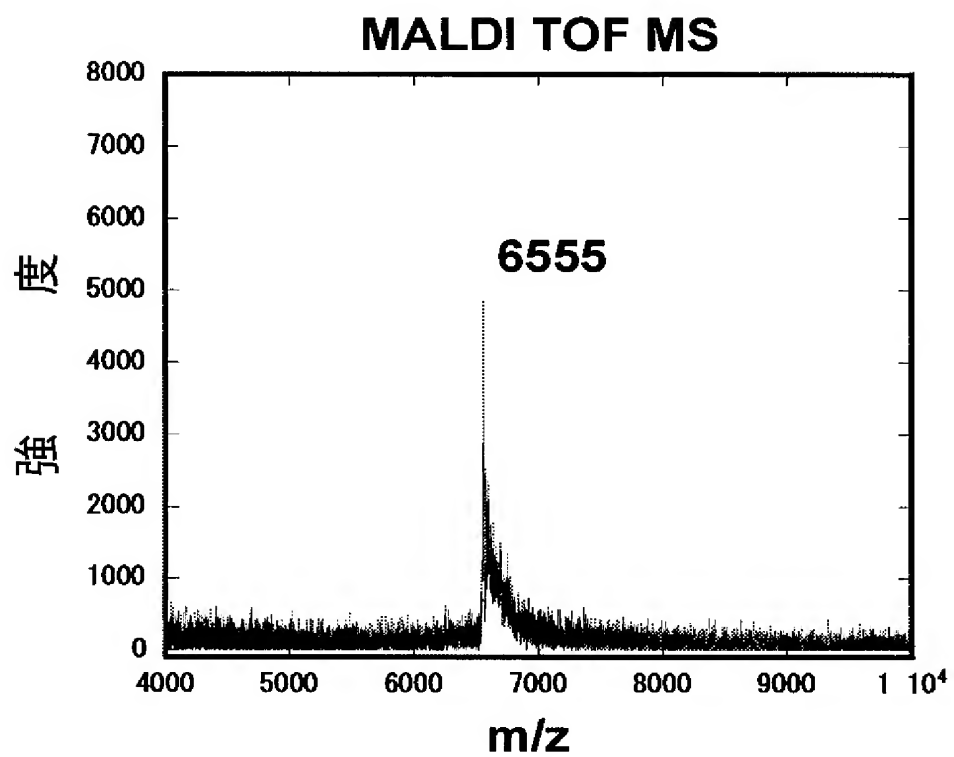
[図1A]



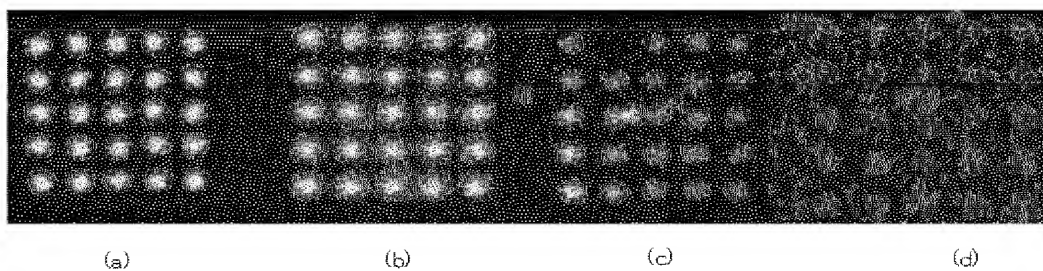
[図1B]



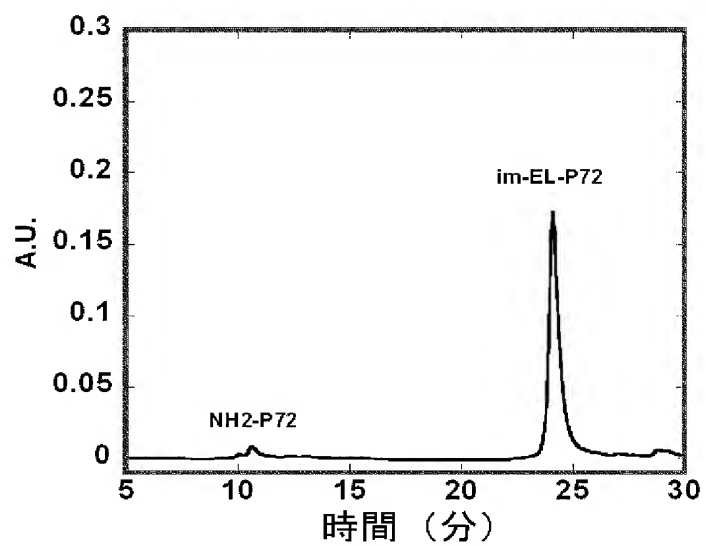
[図2]

 $m/z = 6565$ Matix : 3-HPA

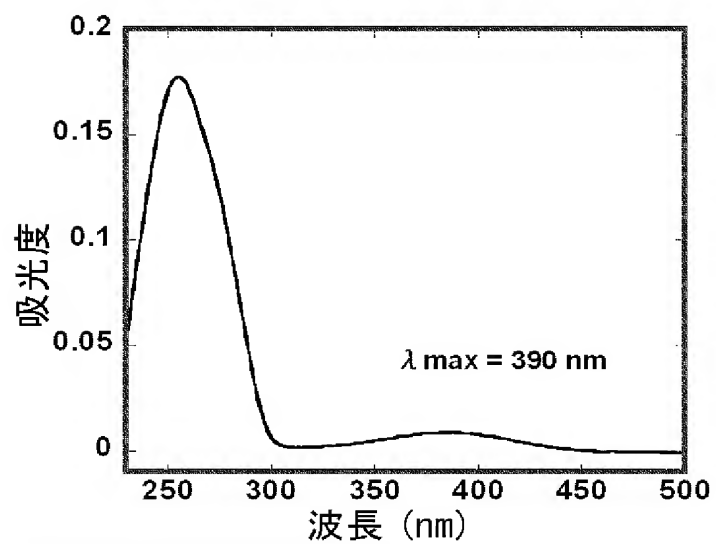
[図3]



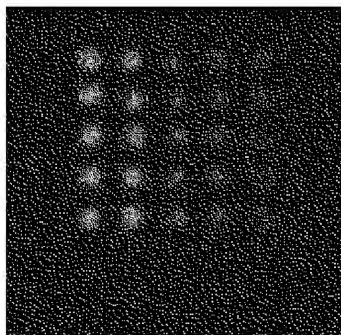
[図4A]



[図4B]

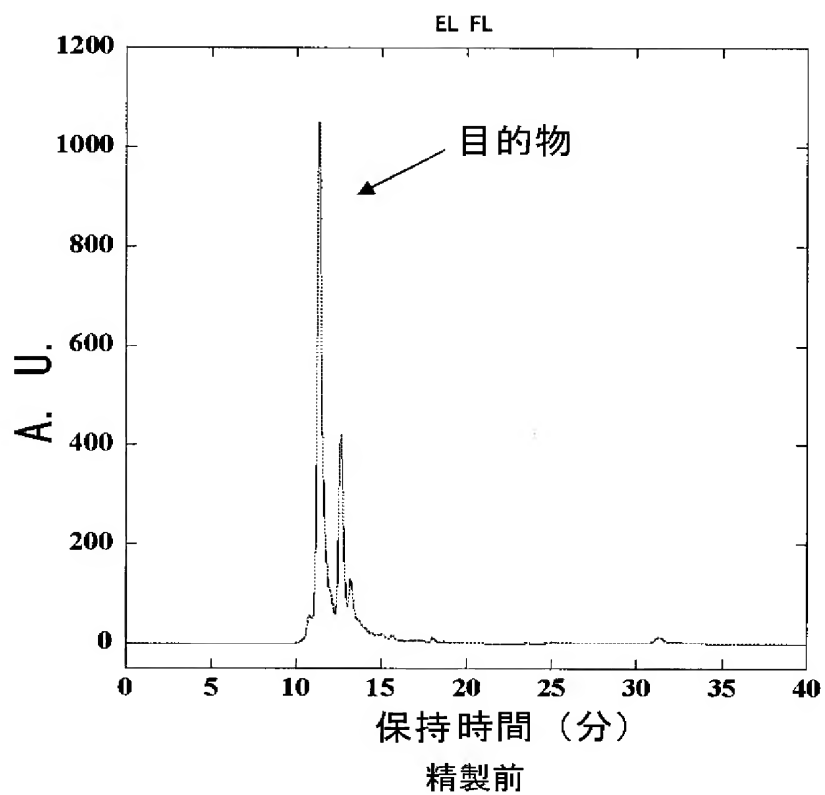


[図5]

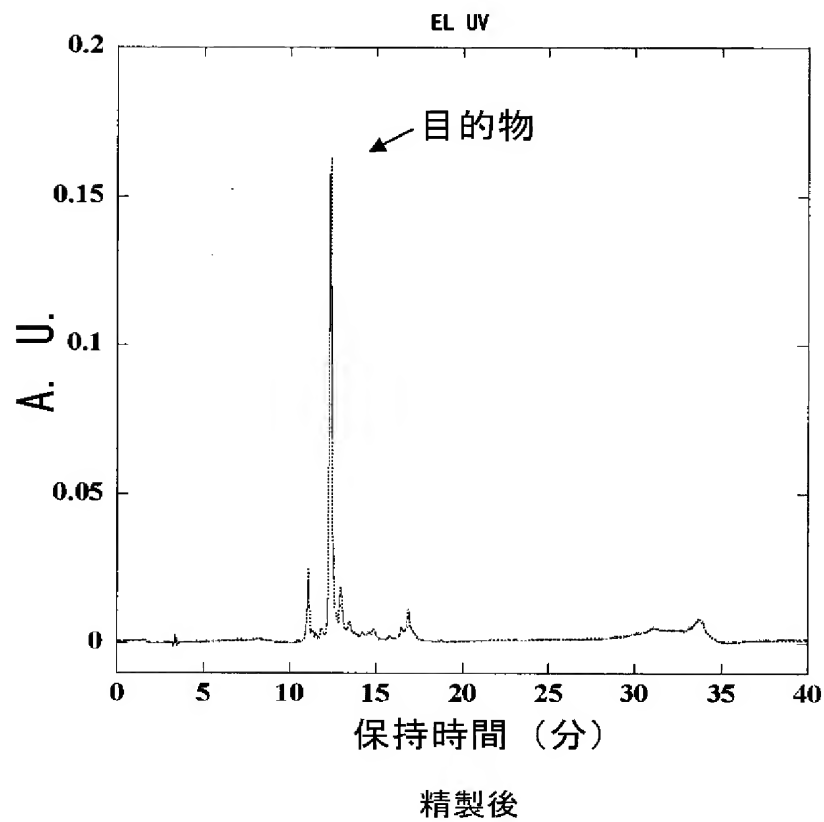


(a) (b) (c) (d) (e)

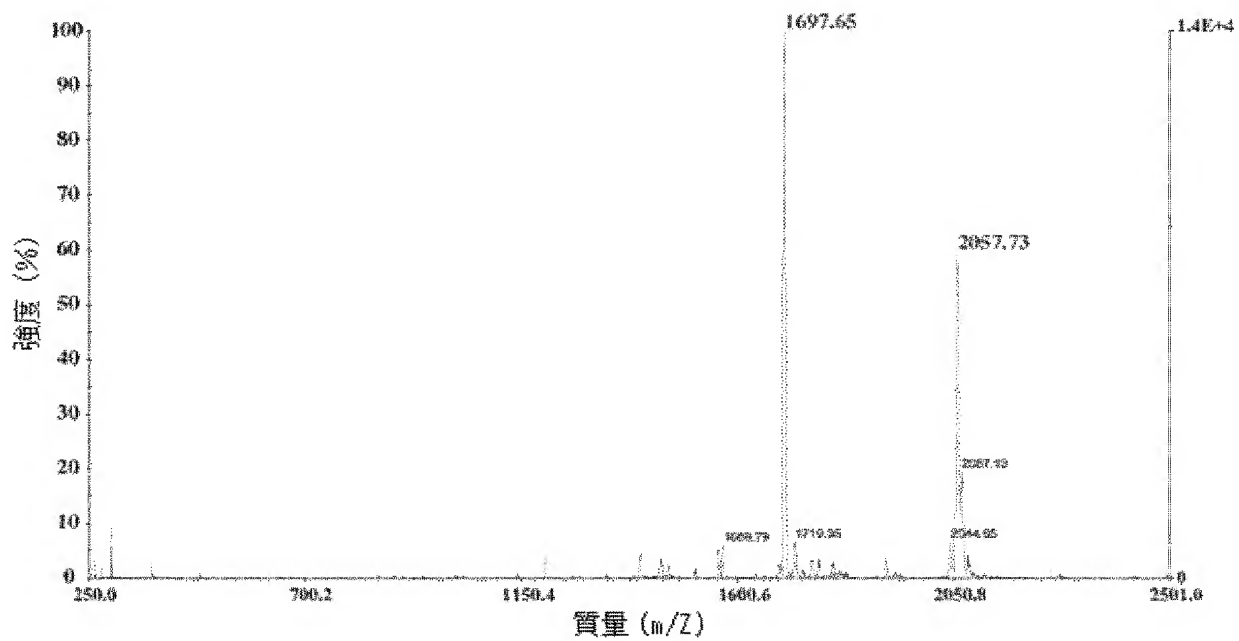
[図6A]



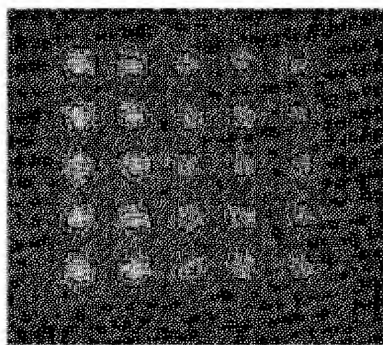
[図6B]



[図7]

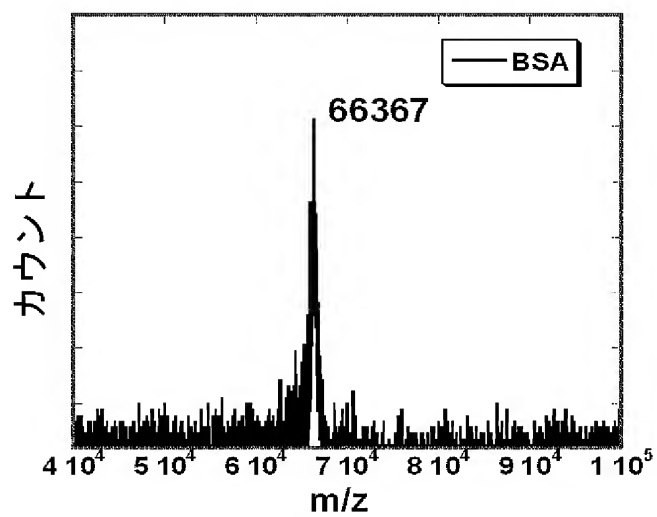


[図8]

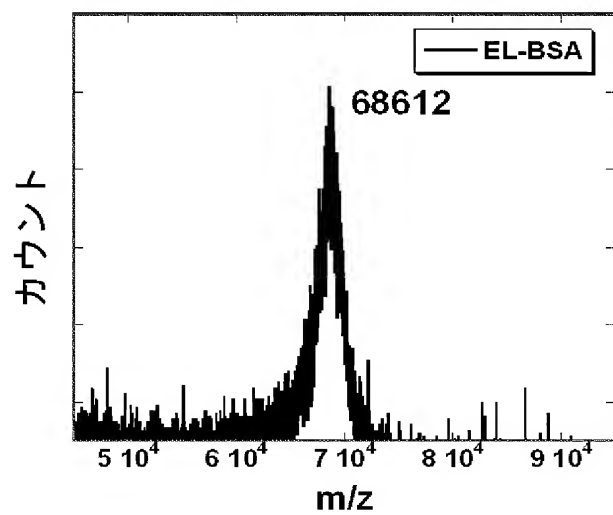


(a) (b) (c) (d) (e)

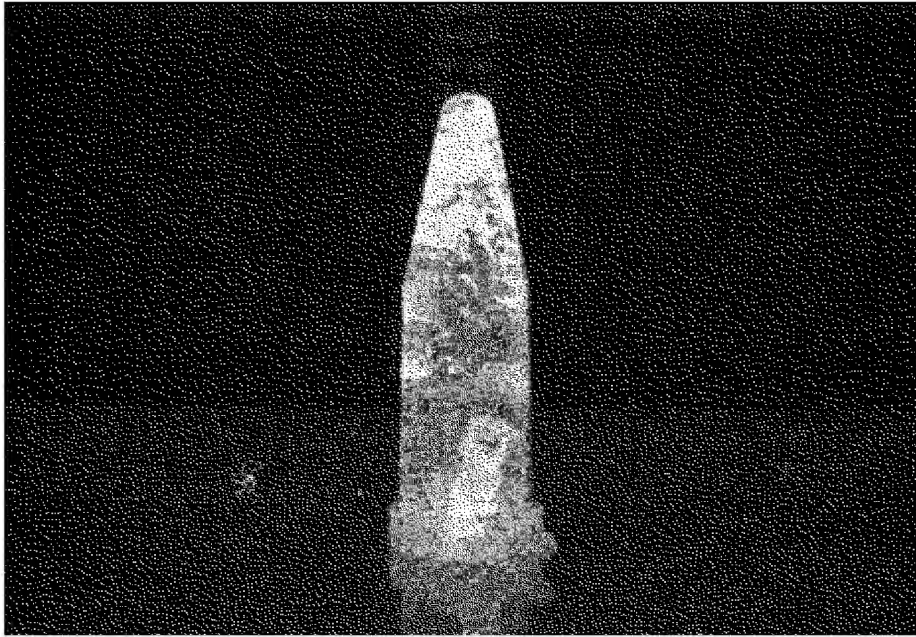
[図9A]



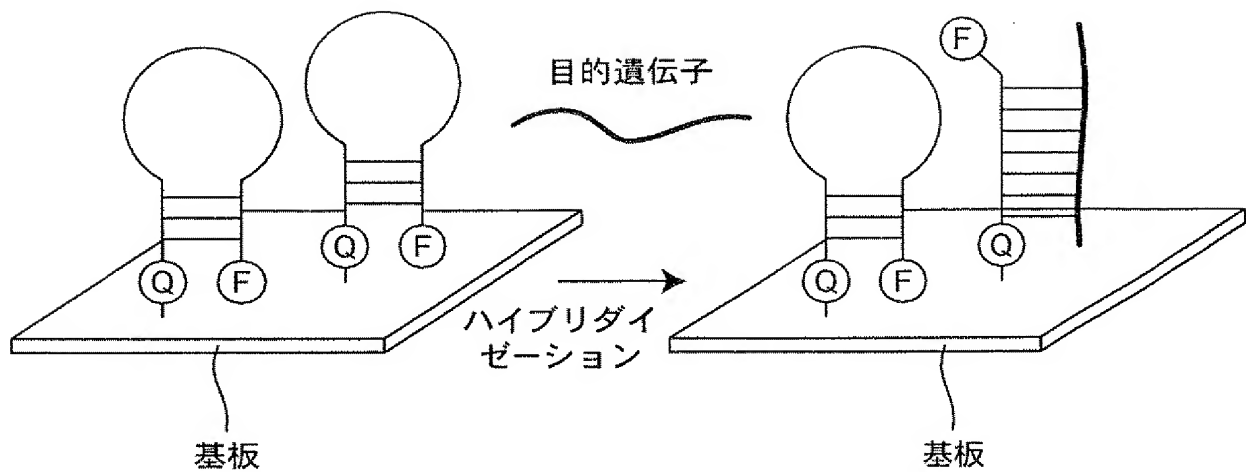
[図9B]



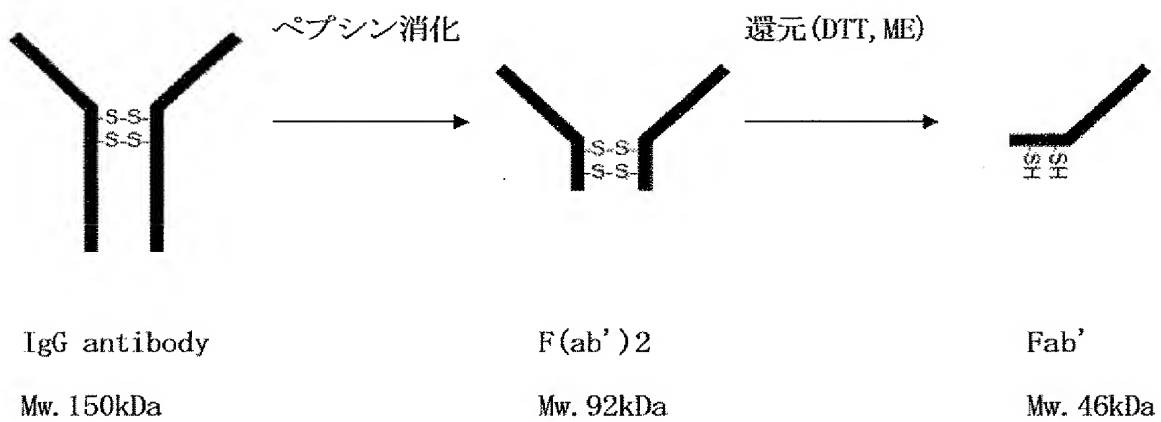
[図10]



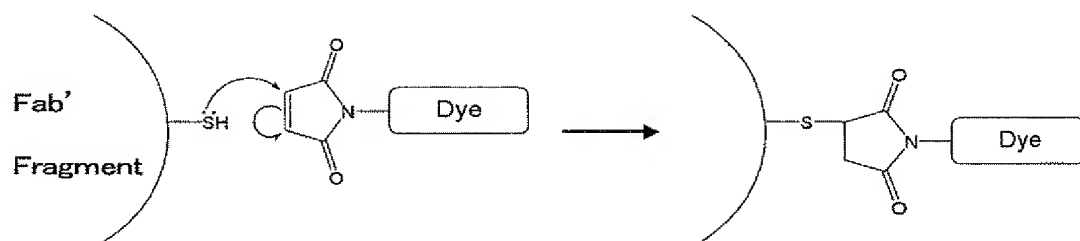
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/53, G01N33/58, G01N37/00, G01N21/64, G01N21/66,
C12Q1/68, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/53, G01N33/58, G01N37/00, G01N21/64, G01N21/66,
C12Q1/68, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-505464 A (Igen Inc.), 03 June, 1997 (03.06.97),	1-4, 11, 12, 18, 19, 22-32
Y	& AU 9478407 A & CA 2172248 C & DE 69432419 E & EP 722508 A & US 6048687 A & WO 95/08644 A	5-10, 13-17, 20, 21
X	JP 2001-153870 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.),	1-4, 11, 12, 18, 19, 22-32
Y	08 June, 2001 (08.06.01), & EP 1148119 A & US 6482640 B & WO 01/38482 A	5-10, 13-17, 20, 21
A	JP 2002-173673 A (Keio University), 21 June, 2002 (21.06.02), (Family: none)	1-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 March, 2005 (22.03.05)

Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019215

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-161135 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 04 June, 2002 (04.06.02), (Family: none)	1-32
Y	JP 2001-288197 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 16 October, 2001 (16.10.01), & US 2002/0064782 A & EP 1152008 A	5-10, 13-17, 20, 21
Y	JP 2003-532790 A (Coulter International Corp.), 05 November, 2003 (05.11.03), & US 2002/0037589 A & EP 1303751 A & WO 01/086264 A	5-10, 13-17, 20, 21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl ⁷	G01N 33/53 C12Q 1/68	G01N 33/58 C12Q 1/02	G01N 37/00	G01N 21/64	G01N 21/66
----------------------	-------------------------	-------------------------	------------	------------	------------

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl ⁷	G01N 33/53 C12Q 1/68	G01N 33/58 C12Q 1/02	G01N 37/00	G01N 21/64	G01N 21/66
----------------------	-------------------------	-------------------------	------------	------------	------------

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-505464 A(イゲン, インコーポレーテッド)1997.06.03 & AU 9478407 A & CA 2172248 C & DE 69432419 E	1-4, 11, 12, 18, 19, 22-32
Y	& EP 722508 A & US 6048687 A & WO 95/08644 A	5-10, 13-17, 20, 21
X	JP 2001-153870 A(日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 2001.06.08	1-4, 11, 12, 18, 19, 22-32
Y	& EP 1148119 A & US 6482640 B & WO 01/38482 A	5-10, 13-17, 20, 21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.03.2005

国際調査報告の発送日

05.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101・内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-173673 A(学校法人慶應義塾)2002. 06. 21 (ファミリーなし)	1-32
A	JP 2002-161135 A(富士写真フイルム株式会社)2002. 06. 04 (ファミリーなし)	1-32
Y	JP 2001-288197 A(富士写真フイルム株式会社)2001. 10. 16 & US 2002/0064782 A & EP 1152008 A	5-10, 13-17, 20, 21
Y	JP 2003-532790 A(コールター インターナショナル コーポレイ ション)2003. 11. 05 & US 2002/0037589 A & EP 1303751 A & WO 01/086264 A	5-10, 13-17, 20, 21